



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO IMPLANTODONTIA**

JOSÉ JOAQUÍN LÓPEZ MARCOS

**IMPREGNAÇÃO DE COLÁGENO EM ARCABOUÇOS
COMPÓSITOS PARA AUMENTO DAS PROPRIEDADES
FÍSICAS E MECÂNICAS**

**FLORIANÓPOLIS, SC
2017**

JOSÉ JOAQUÍN LÓPEZ MARCOS

**IMPREGNAÇÃO DE COLÁGENO EM ARCABOUÇOS
COMPÓSITOS PARA AUMENTO DAS PROPRIEDADES
FÍSICAS E MECÂNICAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Odontologia na área de concentração de Implantodontia.

Orientador: Prof. Dr. César A. Magalhães Benfatti.

Co-orientador: Prof. Dr. Águedo Aragones

**FLORIANÓPOLIS, SC
2017**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Marcos, José Joaquín López
Impregnação de Colágeno em Arcabouços Compósitos
para Aumento das Propriedades Físicas e Mecânicas /
José Joaquín López Marcos ; orientador, César Augusto
Magalhães Benfatti, coorientador, Águedo Aragonés,
2017.
82 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Odontologia,
Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Odontologia. 2. Regeneração óssea. 3.
Engenharia de tecidos. 4. PLGA. 5. Cerâmica
bifásica. I. Benfatti, César Augusto Magalhães .
II. Aragonés, Águedo. III. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Odontologia. IV. Título.

JOSÉ JOAQUÍN LÓPEZ MARCOS

**IMPREGNAÇÃO DE COLÁGENO EM ARCABOUÇOS
COMPÓSITOS PARA AUMENTO DAS PROPRIEDADES
FÍSICAS E MECÂNICAS**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Odontologia”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Florianópolis, 14 de agosto de 2017.

Prof^a. Dr^a. Elena Riet Correa Rivero
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. César A. Magalhães Benfatti
Presidente
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Ariadne Cristiane Cabral da Cruz
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Caroline Freitas Rafael
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Marco Aurélio Bianchini
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Deus em primeiro sempre, porque nos coloca no lugar e tempo que entende que é certo para nós, sempre confio na sua vontade.

*Aos meus filhos, **Alejandro e Maurício** que tiveram que suportar minha ausência por todo este tempo.*

À minha esposa **Ivannia**, pela compreensão e apoio durante o tempo que permaneci longe de casa.

Aos meus pais, **José Ramón e Aleida**, pelo apoio que me dão até hoje.

As minhas irmãs, **Grecia e Jaqueline** pelos conselhos e carinho.

Ao meu orientador professor **César Benfatti**, por todo conhecimento clínico transmitido e a oportunidade de instruir-me na pesquisa, cada questão que o senhor apontava para mim e outros colegas me deixaram um bom aprendizado.

Ao **Prof Magini** obrigado por me ensinar dentro e fora da sala de aula. Fui influenciado a para crescer como profissional e como pessoa.

Ao **Prof Cardoso** pela dedicação no ensino integral de cada aluno, dentro e fora da sala de aula. O senhor conseguiu transmitir a mensagem de uma maneira sincera e motivadora para quem tem interesse em escutar e aprender, será recordado por mim sempre.

Ao **Prof Bianchini** pelo aprendizado na clínica e a maneira particular de transmitir o seu conhecimento, ensinando tudo o que o aluno quer aprender.

Ao **Águedo** que acompanhou todo o trabalho tirando qualquer dúvida durante o processo e o **Gabriel** que com sua disposição sempre me ajudou.

A colega e amiga, **Elvira**, da engenharia de materiais que chegou com toda disposição para me ajudar e se manteve sempre por perto.

Ao **Arthur e Otavio**, do Laboratório de Engenharia Biomecânica, por terem realizado o ensaio mecânico e toda ajuda proporcionada.

A todos os alunos da graduação, especialmente, **Matteus, Hary e Carla**, que tive a oportunidade de orientar na clínica.

A todos os colegas e amigos de mestrado e doutorado, pela compreensão e o tempo compartilhado nestes dois anos dentro da “família” CEPID, em especial aos amigos **Jair, Daniel, Artur, Abraão, Juan F, Miguel, Bernardo, Gaby, Carol, Edwin, Patrícia, Renata, Maria Elisa, Nathalia, Mariane, Jávier, Karin. A Silvane**, sempre disposta a ajudar.

Ao **Ministério de Defesa da República Dominicana** por permitir continuar com minha formação no Brasil.
A **Universidade Federal de Santa Catarina**, pela honra de através de seu programa de pós-graduação voltar a ser estudante e “reinventar-me a mim mesmo”.

Muito obrigado a todos!

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCP – Fosfato de cálcio bifásico

β -TCP – Fosfato tricálcico β

EDS – Espectroscopia de raio-X por dispersão de energia

HA – Hidroxiapatita

HA+ TCP – Hidroxiapatita e fosfato tricálcico

LG 824 S – Poli (L-lático-co-glicólico)

LT 706 S – Poli (L-ácido lático-co-trimetileno carbonato)

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

PGA – Poliacido glicólico

PLA – Poliacido lático

PLGA – Poliacido (D,L-lático-co-glicólico)

PLGA/BCP – Poliacido lático co-glicólico e fosfato de cálcio bifásico

ROG – Regeneração óssea guiada

SC/PL - Evaporação de solvente e lixiviação de partículas

TCP – Fosfato tricálcico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Arcabouço compósito de PLGA/HA+ β -TCP.....	30
Figura 2 – Solução aquosa de 1 mm de altura em uma placa petri de 56 mm de diâmetro.....	32
Figura 3 – Superfície em corte do BioOss Block® apresentando porosidade interconectada e morfologia arredondada.....	34
Figura 4 – A sacarose apresenta uma morfologia retangular e granulometria variada com tamanho médio de 500 μ m.....	34
Figura 5 – Imagens no MEV dos compósitos para a superfície. Com colágeno – G1 (A), G2 (C), G3 (E) e sem colágeno – G4 (B), G5 (D), G6 (F)	35
Figura 6 – Imagens no MEV dos compósitos para a seção transversal em corte dos grupos com colágeno. G1 (A,B), G2 (C,D), G3 (E,F).....	36
Figura 7 – Imagens no MEV dos compósitos para a seção transversal em corte dos grupos sem colágeno. G4 (A,B), G5 (C,D), G6 (E,F).....	37
Figura 8 – Comparação entre os compósitos com (A) e sem (B) impregnação de colágeno, que forma uma película sobre o compósito de PLGA/ HA+ β -TCP.....	38
Figura 9 – Análise química de EDS nos grupos G2 (A) e G5 (B) e controle (C).....	39
Figura 10 – Amostras referentes aos grupos impregnados com colágeno (G1, G2 e G3) e o controle, logo após serem retirados da solução. Fica evidente a formação de gota nos grupos G2 e G3	41
Figura 11 – Amostras referentes aos grupos sem colágeno (G4, G5 e G6), logo após serem retirados do líquido, que permaneceu apenas em contato com a superfície do arcabouço.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Divisão dos grupos experimentais de acordo com a proporção e tipo de tratamento.....	30
Tabela 2 – Resultados obtidos sobre a molhabilidade dos grupos de compósitos e controle.....	41
Tabela 3 – Resistência à compressão dos corpos de prova, expressos pelo valor da mediana.....	44
Tabela 4 – Módulo elástico dos corpos de prova, expressos pelo valor da mediana.....	45

SUMÁRIO

RESUMO	17
1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS	24
2.1. OBJETIVO GERAL.....	24
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24

VERSÃO DO ARTIGO EM PORTUGUÊS	25
RESUMO	26
1. INTRODUÇÃO	27
2. MATERIAIS E MÉTODOS	29
2.1. PRODUÇÃO DOS ARCABOUÇOS COMPÓSITOS DE PLGA/HA+ β -TCP.....	29
2.2. IMPREGNAÇÃO COM COLÁGENO.....	30
2.3. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ANÁLISE QUÍMICA.....	31
2.4. AVALIAÇÃO DA MOLHABILIDADE DOS ARCABOUÇOS.....	31
2.5. PROPRIEDADES MECÂNICAS.....	32
2.5.1. Análise estatística.....	32
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
3.1. ESTRUTURA, POROSIDADE E ANÁLISE QUÍMICA DOS ARCABOUÇOS DE PLGA/HA+ β -TCP.....	33
3.2. PROPRIEDADES FÍSICAS DOS ARCABOUÇOS DE PLGA/HA+ β -TCP.....	40
3.3. PROPRIEDADES MECÂNICAS.....	42
3.3.1. Efeito do fosfato de cálcio bifásico e do colágeno nas propriedades mecânicas dos arcabouços compósitos.....	45
4. CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS DO ARTIGO	48

VERSÃO DO ARTIGO EM INGLÊS	52
ABSTRACT	53
1. INTRODUCTION	54
2. MATERIALS AND METHODS	56

2.1. PRODUCTION OF PLGA/HA+ β -TCP COMPOSITE SCAFFOLDS.....	56
2.2. COLLAGEN IMPREGNATION.....	57
2.3. STRUCTURAL CHARACTERIZATION AND CHEMICAL ANALYSIS.....	58
2.4. EVALUATION OF THE SCAFFOLDS WETTABILITY.....	58
2.5. MECHANICAL PROPERTIES.....	59
2.5.1. Statistical Analysis.....	59
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	60
3.1. STRUCTURE, POROSITY AND CHEMICAL ANALYSIS OF PLGA/HA+ β -TCP SCAFFOLDS.....	60
3.2. PHYSICAL PROPERTIES OF PLGA/HA+ β -TCP SCAFFOLDS.....	66
3.3. MECHANICAL PROPERTIES.....	69
3.3.1. Effect of biphasic calcium phosphate and collagen on the mechanical properties of composite scaffolds.....	72
4. CONCLUSION.....	74
ARTICLE REFERENCES.....	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades físico-mecânicas dos arcabouços porosos de PLGA e cerâmica bifásica. Os arcabouços foram fabricados a partir do método de evaporação do solvente e lixiviação de partículas de sacarose, resultando em 70% de porosidade. As proporções produzidas foram 50/50, 60/40 e 40/60 (PLGA/HA+ β -TCP) com colágeno (G1, G2, G3) e sem impregnação de colágeno (G4, G5, G6). As amostras foram analisadas no MEV para caracterizar a superfície, estrutura e interconectividade dos poros. Para avaliar a hidrofilia dos grupos foi utilizado um teste de molhabilidade. Por fim, o ensaio de compressão para avaliar as propriedades mecânicas. Como grupo controle foi utilizado um enxerto xenógeno inorgânico (BioOss Block®, Geistlich, Suíça). As imagens do MEV revelaram que a estrutura tridimensional apresenta porosidade interconectada, cujos poros possuem tamanho e morfologia semelhantes à sacarose, que foi utilizada como material porogênico. Nos grupos sem colágeno, houve a presença de partículas cerâmicas separadas da matriz polimérica. A presença do colágeno na superfície provocou um aumento nas propriedades mecânicas e na molhabilidade deixando-a muito semelhante ao controle. A proporção polímero/cerâmica não influenciou nos valores obtidos de resistência à compressão e módulo de elasticidade. A impregnação de colágeno tipo 1 na estrutura dos arcabouços fez com que estes se tornassem mais hidrofílicos e provocou um desempenho mecânico melhor quando comparado com os que não receberam o tratamento.

Palavras-Chave: Arcabouço; Cerâmica bifásica; PLGA; Engenharia de tecido; Regeneração óssea.

1. INTRODUÇÃO

Na odontologia moderna, a reabilitação de áreas edêntulas está cada vez mais associada à implantodontia. Além disso, muitos estudos acerca de materiais relacionados ao sucesso de um implante estão sendo desenvolvidos, seja a constituição do próprio implante e até mesmo para enxertia e correção de defeitos ósseos.

A deficiência de volume ósseo nos locais onde se pretende instalar um implante pode causar amplos problemas clínicos e deve ser corrigida antes da colocação do implante, segundo o tamanho da perda óssea (LEKHOLM et al., 1986). Para uma regeneração óssea satisfatória muitas vezes é necessária uma técnica de aumento ósseo, sendo a regeneração óssea guiada (ROG) a técnica mais empregada, que têm como princípio a utilização de membranas para servir como barreiras que separam o material enxertado dos tecidos. A ROG é dependente da migração de células pluripotentes e osteogênicas, como os osteoblastos, para o local do defeito ósseo e exclusão de células que impedem a formação óssea como células epiteliais e fibroblastos (DAHLIN et al., 1988).

Nesse contexto, de acordo com Urban (2017), existem diversos materiais de enxertia utilizados na ROG como: enxertos ósseos autógenos particulados, osso bovino mineral inorgânico (ABBM), aloenxertos e materiais sintéticos. Os ossos autógenos, em geral, apresentam três características ou propriedades importantes: a primeira delas é referente à osteocondução, a qual fornece um arcabouço para a formação óssea; a segunda está relacionada ao favorecimento da osteogênese, já que o osso autógeno contém células mesenquimais; e a terceira compreende a osteoindução, pois contém fatores de crescimento. Essas três características ou propriedades principais permitem que o osso autógeno seja considerado padrão-ouro na regeneração óssea. No entanto, o uso de enxertos ósseos autógenos para grandes reconstruções ósseas apresenta desvantagens em relação à quantidade limitada de osso disponível nas áreas de coleta, à morbidade envolvida e às complicações associadas a sua remoção (MCALLISTER e HAGHIGHAT, 2007).

Entretanto, existem outros materiais bastante utilizados que apresentam bons resultados igualmente. Esses materiais têm sido estudados para minimizar a morbidade associada a procedimentos cirúrgicos adicionais para coleta do material de enxertia, como ocorre com enxertos autógenos (URBAN, 2017).

O ABBM é um osso bovino medular esterilizado e desproteínizado, que é osteocondutor e fornece um arcabouço para uma plausível formação óssea. A adequada osteocondutividade se deve pela estrutura natural preservada. A topografia superficial permite um contato apropriado com o coágulo sanguíneo e os canais internos interconectados propiciam o crescimento celular e de vasos sanguíneos satisfatórios para aquela região.

Os aloenxertos são provenientes de cadáveres humanos, podem ser tanto mineralizados ou desmineralizados. O aloenxerto ósseo cortical mineralizado é considerado um material com adequada osteocondução, pois apresenta uma estrutura bastante porosa que permite manutenção de volume, ou seja, preservação de espaço. Já o osso desmineralizado seco-congelado possui osteoindução limitada e sofre reabsorção de forma mais rápida. O grande desafio da utilização de aloenxertos é referente a manutenção da estabilidade dimensional ao longo do tempo. (URBAN, 2017).

Atualmente, muitos estudos estão voltados para o uso de materiais ósseos sintéticos (biomateriais). Segundo Urban (2017), o maior desafio é conseguir uma estrutura natural capaz de permitir uma molhabilidade adequada. Pois, o grande problema dos materiais ósseos sintéticos é que o ângulo de contato superficial é mais plano que nos materiais naturais de enxertia. Assim, a molhabilidade se torna menor e, conseqüentemente, ocorre menos contato com o sangue, o que pode culminar em menos incorporação no osso recém-formado.

Neste contexto, a procura por substitutos ósseos que sejam capazes de imitar o comportamento de um enxerto autógeno, possuindo propriedades osteocondutivas e osteoindutivas, instiga o estudo principalmente na área da engenharia tecidual.

A engenharia de tecidos é um campo altamente multidisciplinar que agrega e depende de especialistas das áreas de

medicina, engenharia mecânica, engenharia de materiais e genética, para desenvolver estruturas extracelulares porosas (arcabouços) que além de gerarem um ambiente apropriado para a regeneração de um órgão ou tecido, servirão de suporte para a formação do mesmo (BRIEN, 2011; DALTON e WOODFI, 2008; MA, 2004).

Um arcabouço ideal para a regeneração de qualquer tecido deve atender a alguns critérios, ser biocompatível, atóxico e promover a adesão, proliferação e diferenciação celular; se degradar, de forma atóxica, a uma taxa que acompanhe a formação do novo tecido; possuir uma arquitetura altamente porosa, sendo que os poros devem ser interconectados e possuir um tamanho propício para assegurar a proliferação e penetração das células, vascularização, adequada difusão de nutrientes para as novas células e as propriedades mecânicas devem ser comparáveis ao do tecido a ser restituído e serem mantidas durante a degradação, ou seja, o arcabouço deve possuir estabilidade mecânica (ALARIBE; MANOTO e MOTAUNG, 2016; BRIEN, 2011; MA, 2004; RAHAMAN et al., 2011).

Estas características são dependentes do biomaterial escolhido para a construção do arcabouço (O'BRIEN, 2011). Os materiais metálicos, cerâmicos e poliméricos são muito utilizados para implantes, entretanto os metais e as cerâmicas carecem de biodegradabilidade no meio biológico e sua processabilidade é limitada (CHEN; USHIDA e TATEISHI, 2002; DALTON e WOODFI, 2008). Por outro lado, os materiais poliméricos apresentam grande versatilidade uma vez que suas propriedades biológicas de degradação e mecânicas podem ser manipuladas através de mudanças em sua composição e estrutura, bem como por apresentarem melhor processabilidade e facilidade em se produzir estruturas porosas.

Por esses motivos, arcabouços de polímeros biodegradáveis, tais como poliácido glicólico (PGA), poliácido láctico (PLA) e seu co-polímero, poliácido láctico-co-glicólico (PLGA), vem sendo muito utilizados na regeneração de tecidos ósseos e outros tecidos mineralizados (CHEN; USHIDA e

TATEISHI, 2002; DALTON e WOODFI, 2008; LAURENCIN et al., 1998; MARRA et al., 1999).

O PLGA é um polímero biodegradável muito utilizado na área médica por oferecer fácil controle de suas propriedades de degradação, contudo, apresenta baixa osteocondutividade e propriedades mecânicas distintas das apresentadas pelo osso trabecular, desta forma, o desenvolvimento de compósitos com maiores propriedade biológicas e mecânicas se faz necessário. (GENTILE et al., 2014; PETER et al., 1998; PORTER; RUCKH e POPAT, 2009).

Seus sub-produtos de degradação, o ácido lático e glicólico, são atóxicos e naturais corpo após serem metabolizados, o que faz com que este polímero seja também biocompatível (DALTON e WOODFI, 2008; PETER et al., 1998). Entretanto, antes de serem convertidos em água e dióxido de carbono, os ácidos podem alterar o pH da região e provocar reações tóxicas e inflamatórias nos tecidos circundantes (LANAO et al., 2013). Devido a isto, tem-se como alternativa o uso de compósitos de PLGA e um material alcalino e que dessa forma, neutralizaria o pH da região.

Em geral, o material alcalino de escolha é o fosfato de cálcio, principalmente o bifásico (BCP), ou seja, apresenta hidroxiapatita (HA) e fosfato tricálcico β (β -TCP). A HA é o principal constituinte inorgânico do osso e exibe uma maior resistência mecânica que o β -TCP mas com uma menor taxa de degradação, portanto, o uso de um BCP associa ambas propriedades/características

A adição de cerâmica bifásica além de neutralizar o pH, agiria de forma a aumentar a osteocondutividade e as propriedades mecânicas do PLGA, sendo que os compósitos baseados em PLGA e HA+TCP, intensificam a atividade de fosfatase alcalina, muito importante para o processo de regeneração (GENTILE et al., 2014; IGNJATOVIĆ et al., 2007; KHOJASTEH et al., 2016; KIM et al., 2006; NAIK et al., 2017; YANG et al., 2006).

Todavia, devido às suas características químicas, o PLGA demonstra ser hidrofóbico, impedindo a formação de uma interface tecido-implante por impossibilitar a penetração das células por sua estrutura tridimensional (PAMULA et al., 2009). Existem diversas

técnicas para se aumentar a adesão celular onde a modificação superficial através do uso de colágeno tipo 1 é utilizada na literatura para a cobertura de diversos materiais com o intuito de mimetizar o ambiente natural das células (KIM et al., 2006; NAIK et al., 2017; WOJAK-CWIK et al., 2013).

O colágeno é o principal componente orgânico do osso, onde o tipo 1 é a principal proteína fribilar estrutural e constitui aproximadamente 90% da matriz orgânica do osso de um adulto (KIM et al., 2006; WOJAK-CWIK et al., 2013). Por ser biocompatível e altamente hidrofílico, o colágeno é capaz de aumentar a adesão, proliferação celular e formação do tecido, em polímeros biodegradáveis como o PLGA (LOKANATHAN e NAICKER, 2014; TONGKUI CUI et al., 2009; WOJAK-CWIK et al., 2013).

Muitas técnicas podem ser empregadas para a produção de arcabouços poliméricos, onde a de evaporação de solvente e lixiviação de partículas é a mais utilizada por ser simples e de fácil controle da estrutura produzida (tamanho de poro, porosidade e interconectividade) (DALTON e WOODFI, 2008; DORATI et al., 2010). Este método consiste na utilização de sais, ceras ou açúcares como agentes porogênicos, que são lixiviados através de uma lavagem, após a evaporação do solvente, para formar a estrutura porosa. Entretanto, a morfologia dos poros é limitada a morfologia do agente porogênico utilizado e a maior desvantagem deste método é a utilização de um solvente orgânico que deve ser eliminado de forma correta, a não deixar resíduos no interior do arcabouço (DALTON e WOODFI, 2008; NAVARRO et al., 2010).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar *in vitro* as propriedades físico-mecânicas e morfológicas dos arcabouços de PLGA/HA+ β TCP nas diferentes proporções com/sem colágeno.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A) Avaliar a influência das diferentes proporções e a adição de colágeno nos arcabouços PLGA/HA+ β TCP e comparar os resultados entre os grupos e com o grupo controle (BioOssTMBlock, Geistlich, Suíça).

B) Avaliar a hidrofília dos arcabouços de PLGA/HA+ β TCP nas diferentes proporções com e sem colágeno e comparar os resultados entre os grupos e com o grupo controle (BioOssTMBlock, Geistlich, Suíça).

C) Avaliar as propriedades mecânicas dos arcabouços de PLGA/HA+ β TCP nas diferentes proporções com e sem colágeno e comparar os resultados entre os grupos com o grupo controle (BioOssTMBlock, Geistlich, Suíça).

D) Determinar a melhor composição entre os grupos dos arcabouços de PLGA/HA+ β TCP utilizando propriedades físicas e mecânicas como resposta.

VERSÃO DO ARTIGO EM PORTUGUÊS

Impregnação de colágeno em arcabouços compósitos para aumento das propriedades físicas e mecânicas

José Joaquín López Marcos^{1*}, Gabriel Leonardo Magrin¹, Águedo Aragonés², Ricardo de Souza Magini¹, Elvira Lopes³, César A. Magalhães Benfatti¹.

¹ Centro de Ensino e Pesquisas em Implantes Dentários (CEPID), Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO), Departamento de Odontologia (ODT), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, 88040-900, Santa Catarina, Brasil.

² Diretor e Pesquisador do Biocentro - Florianópolis – Santa Catarina – Brasil.

³ Núcleo de Pesquisas em Materiais Cerâmicos e Compósitos (CERMAT), Departamento de Engenharia Mecânica (EMC), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, 88040-900, Santa Catarina, Brasil

* Autor correspondente: José Joaquín López Marcos
jjlmarcos@yahoo.com

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades físico-mecânicas dos arcabouços porosos de PLGA e cerâmica bifásica. Os arcabouços foram fabricados a partir do método de evaporação do solvente e lixiviação de partículas de sacarose, resultando em 70% de porosidade. As proporções produzidas foram 50/50, 60/40 e 40/60 (PLGA/HA+ β -TCP) com colágeno (G1, G2, G3) e sem impregnação de colágeno (G4, G5, G6). As amostras foram analisadas no MEV para caracterizar a superfície, estrutura e interconectividade dos poros. Para avaliar a hidrofília dos grupos foi utilizado um teste de molhabilidade. Por fim, o ensaio de compressão para avaliar as propriedades mecânicas. Como grupo controle foi utilizado um enxerto xenógeno inorgânico (BioOss Block®, Geistlich, Suíça). As imagens do MEV revelaram que a estrutura tridimensional apresenta porosidade interconectada, cujos poros possuem tamanho e morfologia semelhantes à sacarose, que foi utilizada como material porogênico. Nos grupos sem colágeno, houve a presença de partículas cerâmicas separadas da matriz polimérica. A presença do colágeno na superfície provocou um aumento nas propriedades mecânicas e na molhabilidade deixando-a muito semelhante ao controle. A proporção polímero/cerâmica não influenciou nos valores obtidos de resistência à compressão e módulo de elasticidade. A impregnação de colágeno tipo 1 na estrutura dos arcabouços fez com que estes se tornassem mais hidrofílicos e provocou um desempenho mecânico melhor quando comparado com os que não receberam o tratamento.

Palavras-Chave: Arcabouço; Cerâmica bifásica; PLGA; Compósito; Colágeno; Regeneração óssea.

1. INTRODUÇÃO

A engenharia de tecidos é um campo que reuni diversas áreas do conhecimento, desde a área médica à engenharia, sendo considerada como multidisciplinar e interdisciplinar, fazendo uso de diversos materiais e métodos de fabricação para desenvolver estruturas extracelulares (arcabouços) que possuam as características mais adequadas para sua aplicação (MA, 2004; PAMULA et al., 2009).

Os materiais poliméricos são muito utilizados como biomateriais devido à grande flexibilidade no controle de suas propriedades e processamento através da manipulação da composição e estrutura química (CHEN; USHIDA; TATEISHI, 2002; DALTON; WOODFI, 2008; LANA O et al., 2013). Os polímeros naturais e principalmente os sintéticos estão ganhando grande atenção no âmbito da engenharia tecidual com aplicações ósseas e em outros tecidos mineralizados

Polímeros sintéticos são utilizados em aplicações médicas desde a década de 60, onde os mais comuns para a produção de arcabouços, são os poliácidos-alfa-hidroxi lícos (ex.: poliácido láctico (PLA), poliácido glicólico (PGA) e seu copolímero poliácido láctico-co-glicólico (PLGA), dentre estes, o PLGA é o mais utilizado por oferecer melhor controle das propriedades de degradação. Seus subprodutos resultantes são ácido láctico e ácido glicólico, que são substâncias não tóxicas e naturais ao metabolismo humano sendo eliminadas na forma de dióxido de carbono e água (GENTILE et al., 2014; LANA O et al., 2013; PETER et al., 1998; PORTER; RUCKH; POPAT, 2009). Entretanto, antes de serem metabolizados, os ácidos podem induzir reações adversas como inflamação nos tecidos circundantes por alterarem o pH da região. Uma técnica empregada é a adição de substâncias alcalinas para neutralizar a acidez dos produtos de degradação (YANG et al., 2006). Os fosfatos de cálcio além de serem materiais alcalinos, possuem cálcio e fósforo, constituintes naturais do osso, portanto, neutralizariam o pH e aumentariam as propriedades osteocondutivas do PLGA (GENTILE et al., 2014; KHOJASTE H et al., 2016; LEGEROS, 2002; MA, 2004; SHUAI et al., 2013; YANG et

al., 2006). Sendo que o uso de fosfatos de cálcio combinados ao PLGA intensifica a atividade de fosfatase alcalina, que é muito importante para a diferenciação osteoblástica, o qual é determinante no processo de regeneração (IGNJATOVIĆ et al., 2007).

A principal desvantagem do uso do PLGA é a sua natureza hidrofóbica, a qual impede a penetração e adesão das células em arcabouços desse polímero (KHANG, 2012; PAMULA et al., 2009). Contudo, a modificação superficial através da adição de polímeros naturais como o colágeno Tipo I, pode ser utilizada tendo em vista que o colágeno é altamente hidrofílico e principal componente orgânico do osso, este interagiria com as diversas proteínas mimetizando o ambiente natural das células, além de desempenhar um papel estrutural gerando um aumento nas propriedades mecânicas (BRODIE; MERRY; GRANT, 2006; CHRISTOFFERSEN; LANDIS, 1991; HAY, 1991; KHANG, 2012; KIM et al., 2006; NAIK et al., 2017; OU et al., 2011; WOJAK-CWIK et al., 2013).

No presente estudo, o método de evaporação de solvente e lixiviação de partículas (SC/PL) foi usado para fabricar os arcabouços compósitos de PLGA/HA+ β -TCP por ser um método simples e que fornece adequado controle da estrutura produzida (tamanho de poro, porosidade e interconectividade) (DALTON e WOODFI, 2008; DORATI et al., 2010). O arcabouço deve apresentar morfologia e porosidade com dimensões que favoreçam a vascularização, penetração e adesão celular, pois um dos fatores que impedem o reparo ósseo é a falha no suprimento vascular (BUSER, 2009). Os compósitos desenvolvidos foram analisados quanto a sua molhabilidade, resistência a compressão e módulo elástico, com o objetivo de avaliar a sua aplicação como enxerto ósseo na implantodontia.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. PRODUÇÃO DOS ARCABOUÇOS COMPÓSITOS DE PLGA/HA+ β -TCP

Os arcabouços foram produzidos seguindo a metodologia descrita detalhadamente por Messias *et al*, com os polímeros Resomer[®] LG 824 S Poli (L-lático-co-glicólico) 82:18, (Evonik, Essen, Alemanha) e Resomer[®] LT 706 Poli (L-ácido lático-co-trimetileno carbonato) (Evonik, Essen, Alemanha) (MESSIAS; ARAGONES; DUEK, 2009).

O fosfato de cálcio bifásico (70%HA30% β -TCP) (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, Missouri, Estados Unidos) com tamanho de partícula médio de 50 μ m foi a cerâmica bioativa utilizada.

A sacarose, agente porogênico, que possui um tamanho de partícula médio de 500 μ m (Merck[®] Darmstadt, Alemanha) foi utilizada para produzir compósitos com 70% de porosidade, através do método SC/PL.

Os compósitos, Figura 1, foram divididos de acordo com a Tabela 1, onde três dos seis grupos receberam banho de colágeno.

Como grupo de controle foi usado o osso xenógeno inorgânico (Geistlich Bio-Oss Block[®], Suíça), com o intuito de evidenciar a realidade clínica visto que este é um material que na atualidade representa uma alternativa no tratamento de defeitos ósseos.

Figura 1 – Arcabouço composto de PLGA/HA+ β -TCP.



Tabela 1 - Divisão dos grupos experimentais.

Grupos (PLGA/HA+β-TCP)
G1 (50/50) + Colágeno
G2 (60/40) + Colágeno
G3 (40/60) + Colágeno
G4 (50/50)
G5 (60/40)
G6 (40/60)
Controle Bio-Oss Block®

2.2. IMPREGNAÇÃO COM COLÁGENO

Uma solução de 10% de colágeno foi produzida através da diluição de 10g de colágeno hidrolisado tipo 1 em 100ml de água destilada à 60°C. Após a solução atingir a temperatura ambiente,

as amostras foram imersas no líquido sendo deixadas sob vácuo por 10 minutos e a seguir secas ao ar livre por aproximadamente 72h.

2.3. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ANÁLISE QUÍMICA

A superfície e seção transversal seccionada das amostras foi observada com o microscópio eletrônico de varredura HITACHI TM3030 (Japão) para avaliar a morfologia e interconectividade dos poros.

Para confirmar a presença da cerâmica bifásica na superfície da amostra foi realizado a análise química através da energia dispersiva de raios-x (EDS).

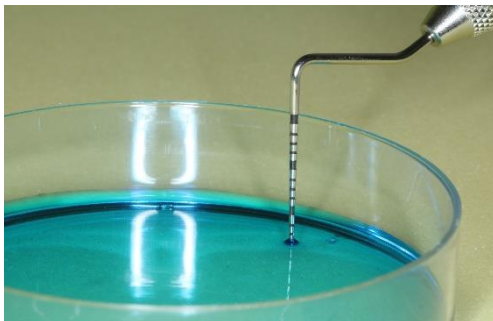
As amostras foram recobertas com uma película micrométrica de material condutor (ouro ou carbono) para a observação.

2.4. AVALIAÇÃO DA MOLHABILIDADE DOS ARCABOUÇOS

Como forma de avaliar a molhabilidade dos arcabouços compósitos foi utilizado o método de imersão, baseado no método tesiométrico de Wilhelmy, entretanto sem medir o ângulo de contato líquido/amostra e sim a absorção do líquido (BARROW; HILLS, 1979; RUPP et al., 2004). Este método de imersão consiste em introduzir o arcabouço com dimensão de 10x10x10 mm³ em 1 mm de solução aquosa com corante, Figura 2, durante 5 minutos, observando a molhabilidade da amostra através da absorção do líquido.

Os parâmetros avaliados neste teste são, o tempo de absorção, a altura que o líquido atinge na superfície externa da amostra, se o líquido atinge o centro do arcabouço e por último, ao retirar da solução é feito o registro com o auxílio de uma câmera se ocorre formação de gota ou não.

Figura 2 – Solução aquosa de 1 mm de altura em uma placa petri de 56 mm de diâmetro.



2.5. PROPRIEDADES MECÂNICAS

A resistência a compressão e o módulo de elasticidade de cada amostra foram medidos usando uma Bose ElectroForce®, 3300 Série II (Minnesota, EUA) a temperatura ambiente. Os corpos de prova quadrados com $10 \times 10 \times 10 \text{ mm}^3$ foram comprimidos com uma velocidade de 1 mm/min segundo a norma ASTM D695-15.

Para os compósitos, a deformação máxima adotada foi de 2 mm segundo a norma ASTM D1621-16 e tensão máxima como sendo a resistência ao escoamento calculada com uma deformação (*offset*) de 0,2%. No grupo controle a tensão máxima considerada foi a tensão de fratura.

O módulo de elasticidade (rigidez) foi calculado ao longo da porção de deformação elástica.

2.5.1. Análise Estatística

O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparação múltipla não paramétrica foi utilizado a fim de determinar se as diferenças entre os grupos, para ambas as propriedades, eram estatisticamente significantes com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

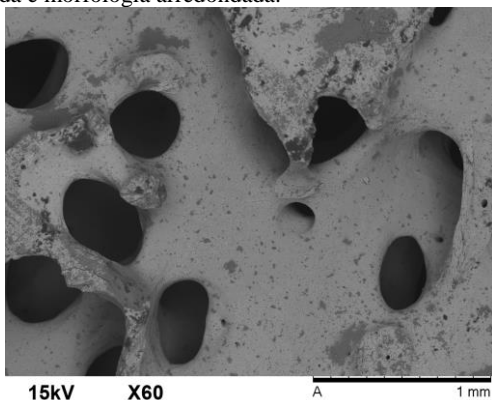
3.1. ESTRUTURA, POROSIDADE E ANÁLISE QUÍMICA DOS ARCABOUÇOS DE PLGA/HA+ β -TCP

Para uma osteocondução bem sucedida é de extrema importância que a estrutura 3D do arcabouço assegure a proliferação, penetração de células e vascularização, incluindo adequada difusão dos nutrientes para as novas células (ALARIBE; MANOTO; MOTAUNG, 2016; DAI; RABIE, 2007; MA, 2004; O'BRIEN, 2011; RAHAMAN et al., 2011).

Para ocorrer o crescimento do novo tecido é necessário que o arcabouço apresente alta conectividade, com poros interconectados, de tamanho e morfologia adequados, por exemplo; arcabouços com poros muito grandes não conseguem manter as células em seu interior, além de provocar uma redução na resistência mecânica; em relação a morfologia, poros arredondados atribuem à estrutura maiores propriedades mecânicas por serem menores concentradores de tensão (O'BRIEN, 2011).

Uma arquitetura semelhante à do osso trabecular humano forneceria as condições ideais para a vascularização e crescimento ósseo (DAI; RABIE, 2007). Neste sentido, o grupo controle (Bio-Oss Block®), Figura 3, apresenta a arquitetura ideal para uma osteocondução bem sucedida, porém com baixa resistência mecânica.

Figura 3 - Superfície em corte do BioOss® apresentando porosidade interconectada e morfologia arredondada.



Com o intuito de criar essa estrutura ideal foi utilizado o método de evaporação de solvente e lixiviação de partículas, que produziu uma estrutura altamente porosa, com microporos, mesoporos e macroporos de dimensão em torno de 120, 220 e 680 μm no formato do agente porogênico (sacarose), Figura 4 e 5.

Figura 4 - A sacarose apresenta uma morfologia retangular e granulometria variada com tamanho médio de 500 μm .

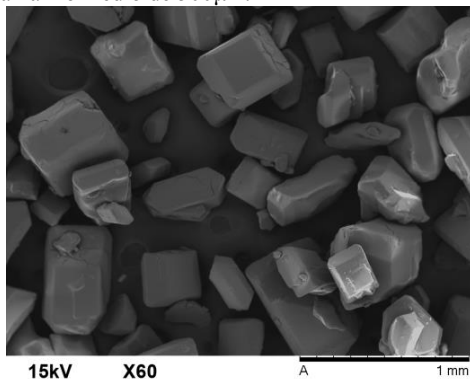
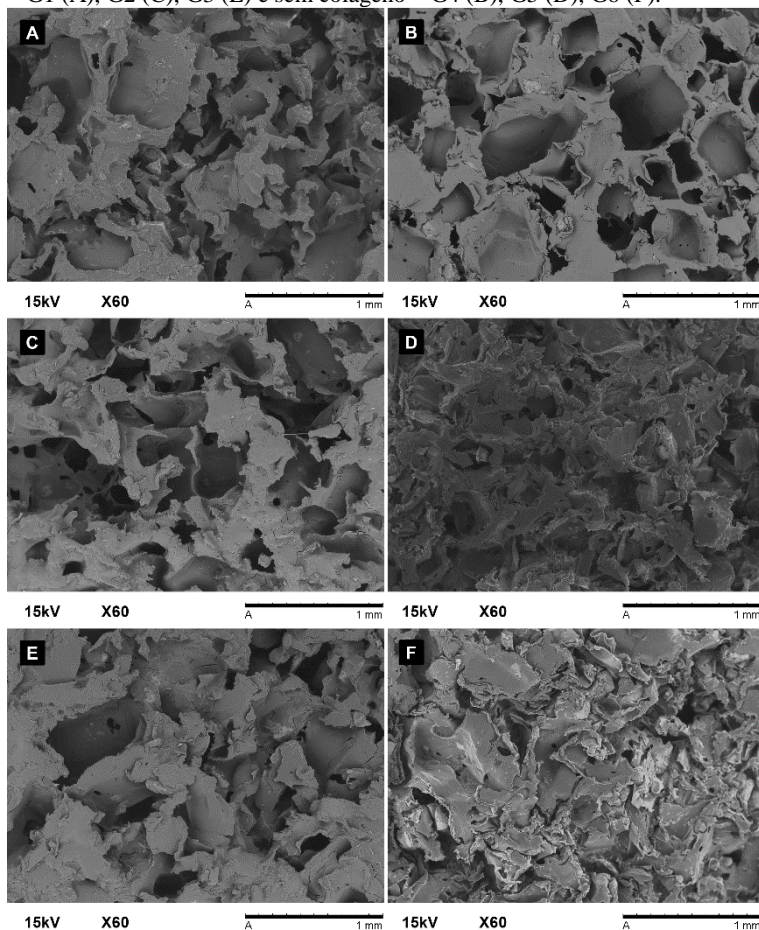


Figura 5 – Imagens no MEV dos compósitos para a superfície. Com colágeno – G1 (A), G2 (C), G3 (E) e sem colágeno – G4 (B), G5 (D), G6 (F).



Além de alta porosidade, os compósitos apresentaram alta interconectividade, como mostrado nas Figuras 6 e 7.

Essa estrutura formada, resulta em maior área superficial e maior capacidade de retenção de fluídos, o que fornece à estrutura

condições para sustentar a vascularização e formação do novo tecido.

Figura 6 – Imagens no MEV dos compósitos para a seção transversal em corte dos grupos com colágeno. G1 (A,B), G2 (C,D), G3 (E,F).

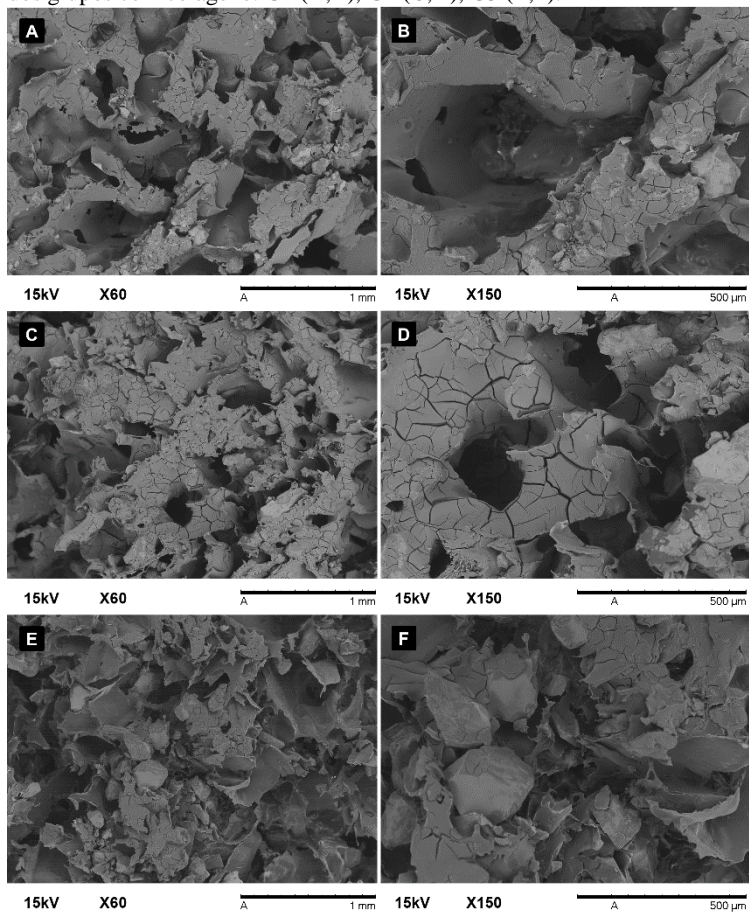
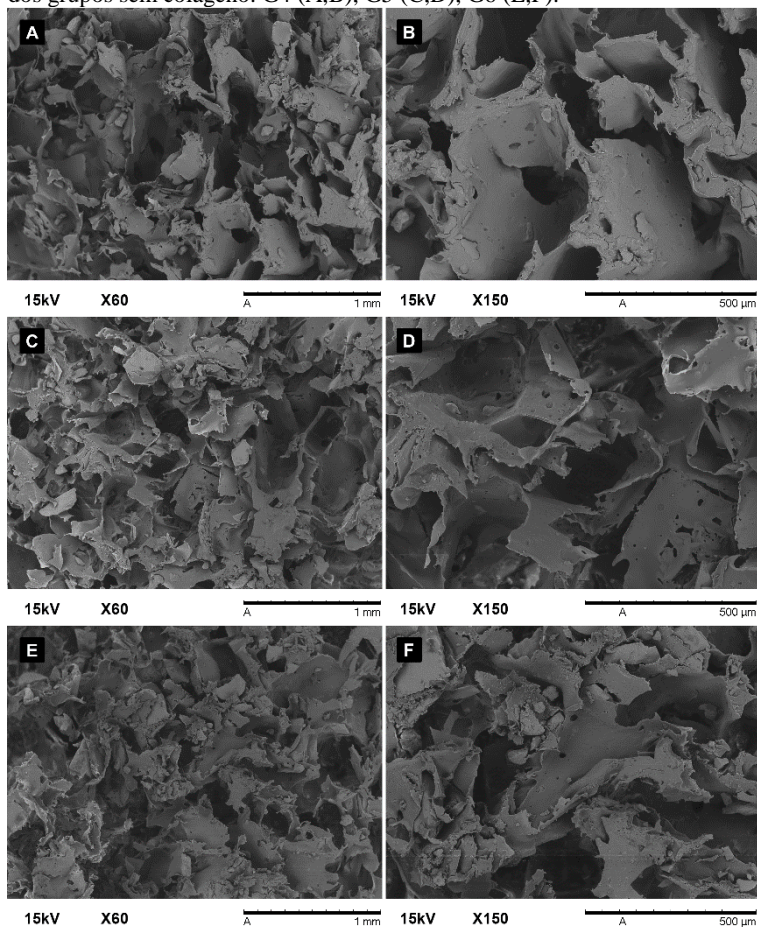


Figura 7 – Imagens no MEV dos compósitos para a seção transversal em corte dos grupos sem colágeno. G4 (A,B), G5 (C,D), G6 (E,F).

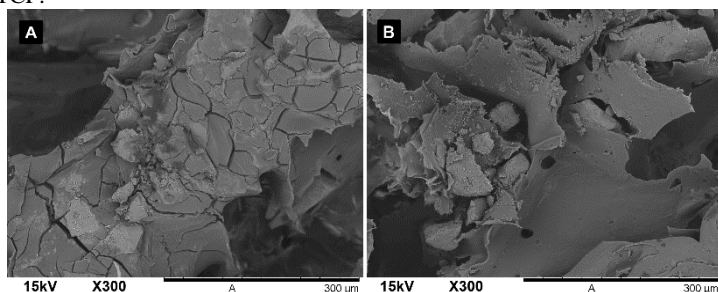


As partículas cerâmicas estão dispersas pela matriz polimérica, entretanto, formando aglomerações que aumentam com a proporção de cerâmica, bem como a quantidade expostas à superfície. Essas aglomerações e o fato de que os fosfatos de cálcio

não estão presos à matriz (o PLGA não recobre as partículas), devido a uma possível falta de interação química entre a cerâmica e o PLGA, podem prejudicar a resistência mecânica dos compósitos.

O colágeno, além de arredondar os poros irregulares formados na lixiviação da sacarose (Figura 6) é responsável por recobrir as partículas cerâmicas, que ficam expostas, bem como toda a matriz de PLGA, como mostram as Figuras 6 e 8.

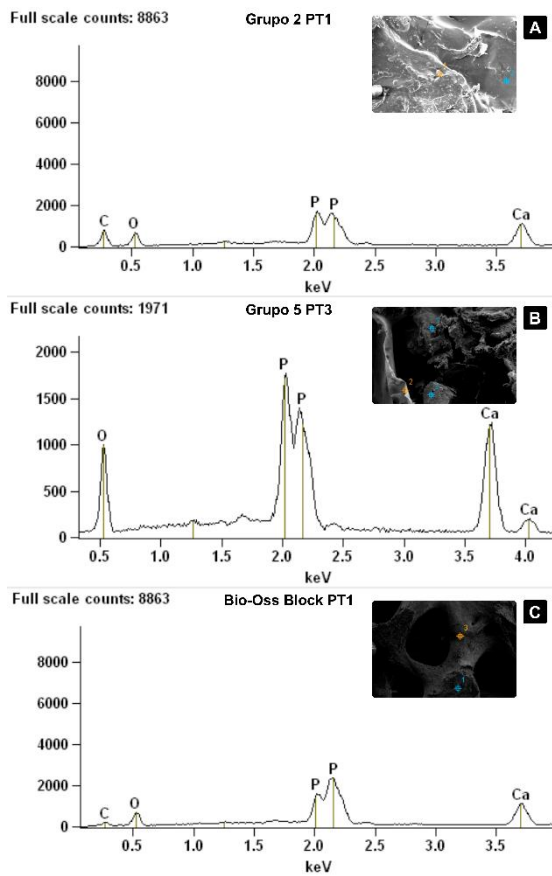
Figura 8 – Comparação entre os compósitos com (A) e sem (B) impregnação de colágeno, que forma uma película sobre o compósito de PLGA/HA+ β -TCP.



O recobrimento da cerâmica pelo colágeno, se dá ao fato de que ocorre uma interação química entre ambos, resultado sustentado pela literatura, pois, o osso, é constituído principalmente de dois compostos, colágeno tipo 1 que é responsável por 90% da matriz orgânica e fosfatos de cálcio, onde a HA é o principal composto inorgânico (GENTILE et al., 2014; KIM et al., 2006; WOJAK-CWIK et al., 2013).

Adicionalmente, esta semelhança química é outra característica importante para um enxerto. O tecido ósseo, tanto humano como bovino (Figura 9 C), é rico em cálcio (Ca) e fósforo (P) (provenientes dos fosfatos de cálcio). Os arcabouços também apresentaram esses elementos em sua composição, no entanto, a presença de cerâmica exposta é variante (Figura 9 A e B), dependendo da proporção polímero/cerâmica e se o arcabouço foi impregnado com colágeno, como explicado anteriormente nessa seção.

Figura 9 – Análise química de EDS nos grupos G2 (A) e G5 (B) e controle (C).



3.2. PROPRIEDADES FÍSICAS DOS ARCABOUÇOS DE PLGA/HA+ β -TCP

A absorção de fluídos nos biomateriais é muito importante e está relacionada a capacidade de reparo do tecido através do transporte e distribuição de células na estrutura dos arcabouços. Os polímeros sintéticos biodegradáveis, como o PLGA, são hidrofóbicos, portanto, inibem a absorção e não permitem a adesão e proliferação celular, impedindo o crescimento de tecido em sua estrutura (ASTM, 2013; KHANG, 2012; PAMULA et al., 2009).

Desta forma, se faz necessário o uso de materiais hidrofílicos, como o colágeno, para aumentar a molhabilidade, tendo em vista que o colágeno irá interagir com as proteínas e criar um ambiente propício para o crescimento e regeneração do tecido (CHRISTOFFERSEN; LANDIS, 1991; KHANG, 2012; LOKANATHAN; NAICKER, 2014; TOMLINS, 2015; VANDROVCOVÁ; DOUGLAS; HAUKE, 2011; WOJAK-CWIK et al., 2013).

A presença do colágeno na superfície dos arcabouços compósitos provocou um aumento na molhabilidade como mostra a Tabela 2 e Figura 10, absorvendo o líquido desde o momento do contato, diferente dos grupos que não receberam o colágeno, Figura 11, onde os arcabouços apresentaram alta hidrofobia não permitindo que o líquido penetrasse em sua estrutura.

Os resultados obtidos são similares aos apresentados na literatura em que estudos *in vitro* feitos em arcabouços de PLGA e PLGA/Colágeno mostraram que o colágeno modificou a superfície do PLGA permitindo que adesão e proliferação celular de forma em maior número comparado ao arcabouço de PLGA (KHANG, 2012; LOKANATHAN; NAICKER, 2014; TOMLINS, 2015) e *in vivo* (LOKANATHAN; NAICKER, 2014).

Tabela 2- Resultados obtidos sobre a molhabilidade dos grupos de compósitos e controle.

Grupos (PLGA/HA+β-TCP)	Tempo de Absorção (seg)	Altura do Líquido (mm)	Atingiu o Centro da Amostra	Formou Gota
G1 (50/50) + Colágeno	129	10	Sim	Não
G2 (60/40) + Colágeno	146	5	Sim	Sim
G3 (40/60) + Colágeno	157	3	Sim	Sim
G4 (50/50)	*	1	Não	Sim
G5 (60/40)	*	1	Não	Sim
G6 (40/60)	*	1	Não	Sim
Controle Bio-Oss Block®	2	10	Sim	Não
* O líquido permaneceu apenas em contato, não houve absorção.				

Figura 10 - Amostras referentes aos grupos impregnados com colágeno (G1, G2 e G3) e o controle, logo após serem retirados da solução. Fica evidente a formação de gota nos grupos G2 e G3.

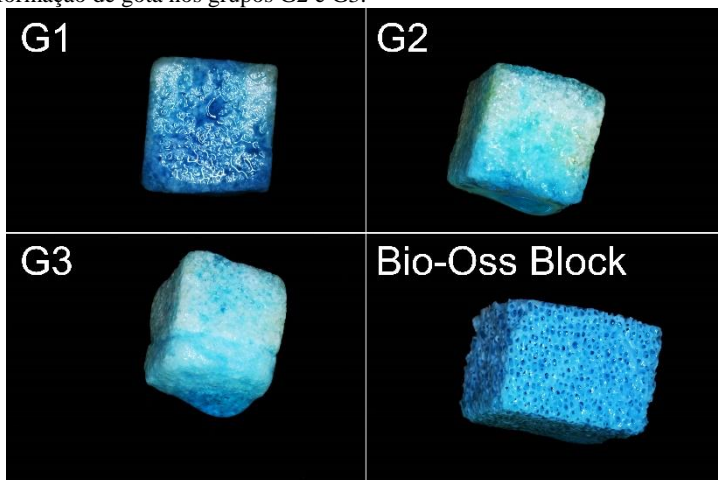
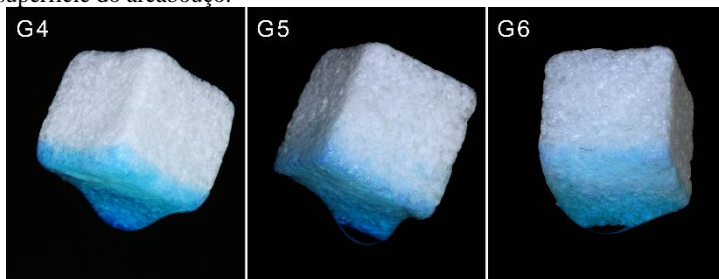


Figura 11 – Amostras referentes aos grupos sem colágeno (G4, G5 e G6), logo após serem retirados do líquido, que permaneceu apenas em contato com a superfície do arcabouço.



É possível perceber que a proporção cerâmica/polímero influencia na molhabilidade, entretanto, essa influência só é percebida nos grupos que foram impregnados com colágeno através da variação do tempo de absorção e na formação de gota (Tabela 2).

Neste contexto, o grupo que apresentou maior semelhança com o grupo controle foi o G1, pois não apresentou a formação de gota ao ser retirado da solução, mostrando que o líquido permaneceu retido na estrutura do arcabouço.

3.3. PROPRIEDADES MECÂNICAS

Os arcabouços utilizados para regeneração óssea devem apresentar propriedades mecânicas similares às do tecido que receberá o enxerto, dentre as quais, módulo de elasticidade e resistência mecânica são as principais.

O módulo elástico é a propriedade que traz informações sobre a rigidez da estrutura do arcabouço, ou seja, sobre a forma com que ele se deformará quando tensionado. Caso a diferença entre módulos seja elevada, ocorrerá uma distribuição heterogênea de tensões, podendo causar a falha do osso ou do implante (O'BRIEN, 2011).

Já no caso da resistência mecânica, esta deve permitir que o arcabouço seja carregado com tensões compressivas e torcionais, sem que haja comprometimento estrutural.

Do ponto de vista prático, os arcabouços devem apresentar uma resistência mínima permitindo seu manuseio durante a implantação (O'BRIEN, 2011).

A maior desvantagem dos Bio-Oss Block® no uso clínico é a sua fratura no momento da fixação devido a sua baixa resistência mecânica, como mostra a Tabela 3. A variação ocorrida nos valores de resistência à compressão para o controle pode ser explicado pela forma com que as tensões se distribuem nos corpos de prova, que apresentam comportamento frágil, como o das cerâmicas; as cargas compressivas se distribuem preferencialmente pelas áreas mais rígidas e, portanto, mais densas. O osso trabecular humano apresenta este comportamento e devido a isto, sua resistência a compressão varia entre 2 e 10 MPa (KHOJASTEH et al., 2016).

Tanto o controle quanto os compósitos apresentaram valores de resistência à compressão inferiores ao do osso, entretanto, os arcabouços com colágeno exibiram valores mais próximos ao osso, conforme Tabela 3.

Tabela 3 - Resistência a compressão dos corpos de prova, expressos pelo valor da mediana.

Resistência a Compressão (MPa)			
Grupos (PLGA/HA+β-TCP)	Mediana	Mínimo	Máximo
G1 (50/50) + Colágeno	**1,5	1,32	1,83
G2 (60/40) + Colágeno	**1,91	1,78	2,22
G3 (40/60) + Colágeno	**1,62	1,51	1,82
G4 (50/50)	*0,96	0,84	1,02
G5 (60/40)	*1,01	0,89	1,67
G6 (40/60)	*1,15	0,76	1,29
Controle Bio-Oss Block®	0,34	0,17	0,46
* Todos apresentaram diferença estatística com o grupo controle			
** Os grupos G1, G2 e G3 apresentaram diferença estatística com os grupos G4, G5 e G6			

O módulo de elasticidade do osso trabecular mais rígido é de 1GPa enquanto que o do PLGA fica em torno de 2GPa; o controle apresentou valores próximos (Tabela 4) mas com grande dispersão (GENTILE et al., 2014; KEAVENY; HAYES, 1993). Por sua vez, os arcabouços exibiram uma rigidez muito menor quando comparado ao PLGA puro, controle e osso trabecular, ou seja, quando implantado e submetido um carregamento, o arcabouço compósito se deformaria elasticamente com maior facilidade do que o osso e, portanto, geraria uma distribuição heterogênea das tensões.

Tabela 4- Módulo elástico dos corpos de prova, expressos pelo valor da mediana.

Módulo de Elasticidade (MPa)			
Grupos (PLGA/HA+β-TCP)	Mediana	Mínimo	Máximo
G1 (50/50) + Colágeno	**18,6	16,7	23,8
G2 (60/40) + Colágeno	**28,3	26,7	40,6
G3 (40/60) + Colágeno	**22,8	21,9	24,5
G4 (50/50)	13,2	11,4	17,3
G5 (60/40)	15,4	13,8	18,6
G6 (40/60)	15,7	9,5	21,6
Controle Bio-Oss Block®	*2882,6	1808,6	3018,9
* O grupo controle apresentou diferença estatística com todos os outros grupos			
** Os grupos G1, G2 e G3 apresentaram diferença estatística com os grupos G4, G5 e G6			

3.3.1. Efeito do fosfato de cálcio bifásico e do colágeno nas propriedades mecânicas dos arcabouços compósitos

De acordo com a análise estatística de Kruskal-Wallis as propriedades mecânicas dos compósitos não são afetadas pela quantidade de cerâmica bifásica adicionada, indo de encontro ao reportado na literatura (EBRAHIMIAN-HOSSEINABADI *et al.*, 2011; GENTILE *et al.*, 2014; SHUAI *et al.*, 2013).

Ebrahimian-Hosseinabadi *et al.* e Shuai *et al.* estudaram o efeito da adição de nano cerâmicas bioativas, BCP e HA respectivamente. Em ambos os estudos, a cerâmica provocou um grande aumento na resistência a compressão e módulo elástico dos arcabouços, entretanto, ao elevar a quantidade de cerâmica para

mais de 20-30% em peso, as duas propriedades diminuíram drasticamente (EBRAHIMIAN-HOSSEINABADI *et al.*, 2011; SHUAI *et al.*, 2013).

Neste estudo, a quantidade de cerâmica utilizada foi de 40, 50 e 60% em peso, sendo que os grupos com 60% em peso, G3 e G6, apresentaram a formação de aglomerados de partículas cerâmicas, fator que poderia diminuir as propriedades mecânicas, o que iria de acordo aos resultados de Ebrahimian-Hosseiniabadi *et al.* e Shuai *et al.*

A variável que se mostrou estatisticamente significativa foi a impregnação dos arcabouços com colágeno. Os grupos que receberam o banho de colágeno (G1, G2 e G3) apresentaram resistência à compressão e módulo elástico maiores que os grupos sem colágeno (G4, G5 e G6).

O colágeno, como visto e descrito na Figura 6 e seção 3.1, possui um papel estrutural e ao recobriu os arcabouços reforçou a estrutura e conferiu maiores propriedades mecânicas.

Brodie *et al.* relataram que a porcentagem de HA e TCP afetou os resultados, onde dos três grupos recobertos com colágeno (75HA25TCP, 50HA50TCP e 25HA75TCP), apenas um grupo (50HA50TCP) apresentou valores de resistência à compressão maiores que o mesmo grupo não recoberto (BRODIE; MERRY; GRANT, 2006).

Ou *et al.* reportaram que a cristalinidade e distribuição da HA afetava a interação com o colágeno, onde as amostras que produziram maior resistência à compressão e módulo elástico foram as que a HA apresentou menor grau de cristalinidade e uma distribuição mais homogênea das partículas (OU *et al.*, 2011).

4. CONCLUSÃO

[1] Os arcabouços de PLGA/HA+ β -TCP fabricados pelo método de evaporação de solvente e lixiviação de partículas apresentaram alta porosidade e interconectividade no formato do material porogênico, resultando em maior área superficial e capacidade de retenção de líquidos.

[2] O colágeno promoveu um aumento na molhabilidade dos arcabouços compósitos onde entre os três grupos, G1, G2 e G3, observa-se a influência da proporção polímero/cerâmica. Dentre os três grupos o que apresentou comportamento mais semelhante ao grupo controle foi o G1 (50PLGA/50HA+ β -TCP), pois a solução permaneceu retida na estrutura ao remover a amostra do líquido.

[3] As propriedades mecânicas também foram influenciadas pela presença de colágeno sendo que os grupos com colágeno apresentaram resultados estatisticamente mais elevados do que os grupos sem colágeno.

[4] A proporção polímero/cerâmica (50/50, 60/40 e 40/60) não afetou estatisticamente as propriedades mecânicas, entretanto, a literatura indica que uma menor proporção de cerâmica seria ideal para o aumento das propriedades mecânicas de resistência e módulo elástico.

[5] Os compósitos desenvolvidos apresentam características que instigam o estudo do comportamento *in vitro* e *in vivo* dos mesmos para aplicação na regeneração óssea.

REFERÊNCIAS DO ARTIGO

- ALARIBE, F. N.; MANOTO, S. L.; MOTAUNG, S. C. K. M. Scaffolds from biomaterials: Advantages and limitations in bone and tissue engineering. **Biologia (Poland)**, v. 71, n. 4, p. 353–366, 2016.
- ASTM. **Standard Guide for Characterization and Testing of Biomaterial Scaffolds Used in Tissue-Engineered Medical Products 1**, 2013.
- BARROW, R. E.; HILLS, B. A critical assessment of the Wilhelmy method in studying lung surfactants. **Journal of physiology**, v. 295, p. 217–27, 1979.
- BRODIE, J. C.; MERRY, J.; GRANT, M. H. The mechanical properties of calcium phosphate ceramics modified by collagen coating and populated by osteoblasts. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 17, n. 1, p. 43–48, 2006.
- BUSER, D. **20 Years of Guided Bone Regeneration in Implant Dentistry**. 2. ed. [s.l.: s.n.].
- CHEN, G.; USHIDA, T.; TATEISHI, T. Scaffold design for tissue engineering. **Macromolecular Bioscience**, v. 2, n. 2, p. 67–77, 2002.
- CHRISTOFFERSEN, J.; LANDIS, W. J. A contribution with review to the description of mineralization of bone and other calcified tissues in vivo. **The Anatomical Record**, v. 230, n. 4, p. 435–450, 1 ago. 1991.
- DAHLIN, C. et al. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. **Plastic & Reconstructive Surgery**, v. 81, p. 672–6, 1988.
- DAI, J.; RABIE, A B. M. VEGF: an essential mediator of both angiogenesis and endochondral ossification. **Journal of dental research**, v. 86, n. 10, p. 937–950, 2007.
- DALTON, P. D.; WOODFI, T. Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering. **Bone**, v. 32, n. 3, p. 2004–2005, 2008.
- DORATI, R. et al. Effect of porogen on the physico-chemical properties and degradation performance of PLGA scaffolds. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, n. 4, p. 694–701, 2010.
- EBRAHIMIAN-HOSSEINABADI, M. et al. Evaluating and Modeling the Mechanical Properties of the Prepared PLGA/nano-BCP Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. **Journal of**

- Materials Science & Technology**, v. 27, n. 12, p. 1105–1112, 2011.
- GENTILE, P. et al. An overview of poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 3, p. 3640–3659, 2014.
- HAY, E. D. Collagen and other matrix glycoproteins in embryogenesis. In: HAY, E. D. (Ed.). **Cell Biology of the Extracellular Matrix**. Second Edi ed. New York, NY: Springer, Boston, MA, 1991. p. 419–462.
- IGNJATOVIĆ, N. L. et al. Micro- and nano-injectable composite biomaterials containing calcium phosphate coated with poly(dl-lactide-co-glycolide). **Acta Biomaterialia**, v. 3, n. 6, p. 927–935, 2007.
- KEAVENY, T. M.; HAYES, W. C. Mechanical Properties of Cortical and Trabecular Bone. **Bone**, n. January 1993, p. 285–344, 1993.
- KHANG, G. **Handbook of Intelligent Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine**. [s.l.] CRC Press, 2012.
- KHOJASTEH, A. et al. Development of PLGA-coated β -TCP scaffolds containing VEGF for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 69, p. 780–788, 2016.
- KIM, S.-S. et al. Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 27, n. 8, p. 1399–1409, 2006.
- LANAO, R. P. F. et al. Physicochemical properties and applications of poly(lactic-co-glycolic acid) for use in bone regeneration. **Tissue engineering. Part B, Reviews**, v. 19, n. 4, p. 380–90, 2013.
- LAURENCIN, C. T. et al. Tissue engineered bone-regeneration using degradable polymers: The formation of mineralized matrices. **Bone**, v. 19, p. S93-99, 1998.
- LEGEROS, R. Z. Properties of osteoconductive biomaterials: Calcium phosphates. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 395, n. 395, p. 81–98, 2002.
- LEKHOLM, U. et al. Marginal tissue reactions at osseointegrated titanium fixtures. (II) A cross-sectional retrospective study. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 15, n. 1, p. 53–61, fev. 1986.

- LOKANATHAN, Y.; NAICKER, A. S. Collagen Coated PLGA Seeded with Neural-Differentiated Human Mesenchymal. p. 353–362, 2014.
- MA, P. X. Scaffolds for tissue fabrication. **Materials Today**, v. 7, n. 5, p. 30–40, 2004.
- MARRA, K. G. et al. In vitro analysis of biodegradable polymer bled/hydroxiapatite composites for bone tissue engineering. **Biomedical Materials Research Part C**, v. 47, p. 324–335, 1999.
- MCALLISTER, B. S.; HAGHIGHAT, K. Bone Augmentation Techniques. **Journal of Periodontology**, v. 78, n. 3, p. 377–396, 2007.
- MESSIAS, A. D.; ARAGONES, A.; DUEK, E. A. DE R. PLGA-Hydroxyapatite Composite Scaffolds for Osteoblastic-Like Cells. **Key Engineering Materials**, v. 396–398, p. 461–464, 2009.
- NAIK, A. et al. The effect of the type of HA on the degradation of PLGA/HA composites. **Materials Science and Engineering C**, v. 70, p. 824–831, 2017.
- NAVARRO, M. et al. Biomaterial scaffold fabrication techniques for potential tissue engineering applications. **Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications**, v. 4, n. 3, p. 141–159, 2010.
- O'BRIEN, F. J. Biomaterials & Scaffolds for Tissue Engineering. **Materials Today**, v. 14, n. 3, p. 88–95, 2011.
- OU, K. L. et al. Effect of collagen on the mechanical properties of hydroxyapatite coatings. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 4, n. 4, p. 618–624, 2011.
- PAMULA, E. et al. Resorbable polymeric scaffolds for bone tissue engineering: The influence of their microstructure on the growth of human osteoblast-like MG 63 cells. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 89, n. 2, p. 432–443, 2009.
- PETER, S. J. et al. Polymer concepts in tissue engineering. **Journal of biomedical materials research**, v. 43, n. 4, p. 422–427, 1998.
- PORTER, J. R.; RUCKH, T. T.; POPAT, K. C. Bone tissue engineering: A review in bone biomimetics and drug delivery strategies. **Biotechnology Progress**, v. 25, n. 6, p. 1539–1560, 2009.
- RAHAMAN, M. N. et al. Bioactive glass in tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 6, p. 2355–2373, 2011.
- RUPP, F. et al. Roughness induced dynamic changes of wettability

of acid etched titanium implant modifications. **Biomaterials**, v. 25, n. 7–8, p. 1429–1438, 2004.

SHUAI, C. et al. Development of composite porous scaffolds based on poly(lactide-co- glycolide)/nano-hydroxyapatite via selective laser sintering. **International Journal of Advanced Manufacturing Technology**, v. 69, n. 1–4, p. 51–57, 2013.

TOMLINS, P. **Characterisation and Design of Tissue Scaffolds**. [s.l: s.n.].

TONGKUI CUI et al. Rapid Prototyping a Double-layer Polyurethane--collagen Conduit and its Schwann Cell Compatibility. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 24, n. 1 Suppl, p. 5–17, 2009.

URBAN, I. Membranes and Graft Materials. In: **Vertical and horizontal ridge augmentation - New perspective**. [s.l.] Quintessence Pub Co, 2017. p. 400.

VANDROVCOVÁ, M.; DOUGLAS, T.; HAUKE, D. Influence of Collagen and Chondroitin Sulfate (CS) Coatings on Poly- (Lactide-co-Glycolide) (PLGA) on MG 63 Osteoblast-Like Cells. v. 8408, n. July, p. 797–813, 2011.

WOJAK-CWIK, I. M. et al. Poly(L -lactide-co-glycolide) scaffolds coated with collagen and glycosaminoglycans: Impact on proliferation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 101, n. 11, p. 3109–3122, 2013.

YANG, F. et al. Poly(1,1-lactide-co-glycolide)/tricalcium phosphate composite scaffold and its various changes during degradation in vitro. **Polymer Degradation and Stability**, v. 91, n. 12, p. 3065–3073, 2006.

VERSÃO DO ARTIGO EM INGLÊS

Impregnation of collagen in composite scaffolds to increase physical and mechanical properties

José Joaquín López Marcos^{1*}, Elvira Lopes², Gabriel Leonardo Magrin¹, Águedo Aragones³, Ricardo de Souza Magini¹, César A. Magalhães Benfatti¹.

¹ Center for Research on Dental Implants (CEPID), Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, 88040-900, Santa Catarina, Brazil.

² Ceramic and Composite Materials Research Group (CERMAT), Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, 88040-900, Santa Catarina, Brazil.

³ Director and Researcher of Biocentro - Florianópolis - Santa Catarina - Brazil.

* Corresponding author: José Joaquín López Marcos
jjlmarcos@yahoo.com

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the physical-mechanical properties of the porous scaffolds of PLGA and biphasic ceramic. The scaffolds were fabricated by solvent casting and particulate leaching technique using sucrose particles as porogen, resulting in 70% porosity. The proportions produced were 50/50, 60/40 and 40/60 (PLGA / HA + β -TCP) with collagen (G1, G2, G3) and without collagen (G4, G5, G6) impregnation. The samples were analyzed in SEM to characterize the surface, structure and interconnectivity of the pores. A wettability test was used to evaluate the hydrophilicity of the groups. Finally, the compression test to evaluate the mechanical properties was performed. An inorganic xenogen graft (BioOss Block®, Geistlich, Switzerland) was used as the control group. SEM images revealed that the three-dimensional structure presented interconnected porosity whose pores had a size and morphology similar to sucrose, which was used as a porogenic material. In the groups without collagen, ceramic particles were detached from the polymeric matrix. The presence of collagen on the structure caused an increase in wettability and mechanical properties leaving it very similar to the control group. The polymer/ceramic ratio did not influence the values of compressive strength and modulus of elasticity. The impregnation of type 1 collagen to the structure of the scaffolds made them more hydrophilic and resulted in a better mechanical performance when compared to those who did not receive the treatment.

Keywords: Scaffold; Biphasic ceramics; PLGA; Composite; Collagen; Bone regeneration.

1. INTRODUCTION

Tissue engineering is a field that brings together several areas of knowledge, from the medical field to the engineering, being considered as multidisciplinary and interdisciplinary, making use of diverse materials and manufacturing methods to develop extracellular structures (scaffolds) that have the characteristics most suitable for its application (MA, 2004; PAMULA et al., 2009).

Polymeric materials are widely used as biomaterials because of the great flexibility in controlling their properties and processing through the manipulation of the composition and chemical structure (CHEN; USHIDA; TATEISHI, 2002; DALTON; WOODFI, 2008; LANA O et al., 2013). Natural and mainly synthetic polymers are gaining a great deal of attention in the field of tissue engineering with bone applications and other mineralized tissues (CHEN; USHIDA e TATEISHI, 2002; DALTON e WOODFI, 2008; MA, 2004).

Synthetic polymers have been used in medical applications since the 1960s, where the most common for the production of scaffolds are poly(α -hydroxy esters) (eg poly(lactic acid) (PLA), poly(glycolic acid) (PGA) and their copolymer poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), among which, PLGA is the most used because it offers better control of degradation properties. Its resulting by-products are lactic acid and glycolic acid, which are nontoxic and natural substances to human metabolism being eliminated in the form of carbon dioxide and water (GENTILE et al., 2014; LANA O et al., 2013; PETER et al., 1998; PORTER; RUCKH; POPAT, 2009). However, before being metabolized, the acids can induce adverse reactions such as inflammation in the surrounding tissues by altering the pH of the region. A technique used to neutralize the acidity of degradation products is the addition of alkaline substances (YANG et al., 2006). Calcium phosphates, besides being alkaline materials, have calcium and phosphorus which are natural constituents of the bone, and therefore, would neutralize the pH and increase the osteoconductive properties of PLGA (GENTILE et al., 2014; KHOJASTE H et al., 2016; LEGEROS,

2002; MA, 2004; SHUAI et al., 2013; YANG et al., 2006). The use of calcium phosphates combined with PLGA enhances alkaline phosphatase activity, which is very important for osteoblastic differentiation, which is determinant in the regeneration process (IGNJATOVIĆ et al., 2007).

The main disadvantage of using PLGA is its hydrophobic nature which prevents the penetration and adhesion of the cells in scaffolds of this polymer (KHANG, 2012; PAMULA et al., 2009). However, superficial modification through the addition of natural polymers such as Type I collagen can be used since collagen is highly hydrophilic and the main organic component of bone. Collagen would interact with the various proteins mimicking the natural environment of the cells, in addition to perform a structural role enhancing the mechanical properties (BRODIE; MERRY; GRANT, 2006; CHRISTOFFERSEN; LANDIS, 1991; HAY, 1991; KHANG, 2012; KIM et al., 2006; NAIK et al., 2017; OU et al., 2011; WOJAK-CWIK et al., 2013).

In the present study, the solvent evaporation and particulate leaching (SC/PL) method was used to fabricate the PLGA/HA+ β -TCP composite scaffolds as a simple method that provides adequate control of the structure produced (size of pore, porosity and interconnectivity) (DALTON and WOODFI, 2008; DORATI et al., 2010). The scaffold must have a morphology and porosity with dimensions that favor vascularization, penetration and cell adhesion, since one of the factors that prevent bone repair is the failure of vascular supply (BUSER, 2009). The composites developed were analyzed for their wettability, compressive strength and elastic modulus in order to evaluate their application as a bone graft in implantology.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. PRODUCTION OF PLGA/HA+B-TCP COMPOSITE SCAFFOLDS

The scaffolds were produced following the methodology described in detail by Messias *et al.* with Resomer® LG 824 S Poly (L-lactic-co-glycolic) 82:18 polymers (Evonik, Essen, Germany) and Resomer® LT 706 Poly (L- lactic acid-co-trimethylene carbonate) (Evonik, Essen, Germany) (MESSIAS; ARAGONES; DUEK, 2009).

Biphasic calcium phosphate (70% HA30% β -TCP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) with a mean particle size of 50 μ m was the bioactive ceramics used.

Sucrose, a porogenic agent, having a mean particle size of 500 μ m (Merck® Darmstadt, Germany) was used to produce composites with 70% porosity by the SC/PL method.

The composites, Figure 1, were divided according to Table 1, where three of the six groups received a collagen impregnation.

As a control group, the inorganic xenogen bone (Geistlich Bio-Oss Block®, Switzerland) was used in order to highlight the clinical reality since it is a material that currently represents an alternative in the treatment of bone defects.

Figure 1 – PLGA/HA+ β -TCP composite scaffold.



Table 1- Division of experimental groups.

Groups (PLGA/HA+β-TCP)
G1 (50/50) + Collagen
G2 (60/40) + Collagen
G3 (40/60) + Collagen
G4 (50/50)
G5 (60/40)
G6 (40/60)
Control Bio-Oss Block®

2.2. COLLAGEN IMPREGNATION

A 10%vol solution of collagen was produced by diluting 10g of hydrolyzed type 1 collagen in 100ml of distilled water at 60°C. After the solution reached room temperature, the samples

were immersed in the liquid being left under vacuum for 10 minutes and then dried in the open air for approximately 72 hours.

2.3. STRUCTURAL CHARACTERIZATION AND CHEMICAL ANALYSIS

The surface and cross section of the samples was observed with the HITACHI TM3030 (Japan) scanning electron microscope to evaluate the morphology and interconnectivity of the pores.

To confirm the presence of biphasic ceramics on the surface of the sample, a chemical analysis was carried out using x-ray dispersive energy (EDS).

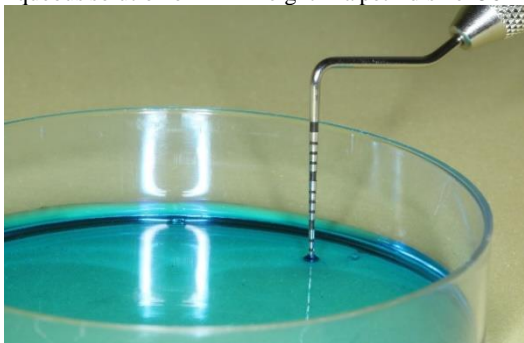
The samples were covered with a micrometric film of conductive material (gold or carbon) for observation.

2.4. EVALUATION OF THE SCAFFOLD WETTABILITY

As a way of assessing the wettability of the composite scaffolds, the immersion method was used, based on the Wilhelmy's method, but without measuring the liquid/sample contact angle, but rather the absorption of the liquid (BARROW; HILLS, 1979; RUPP et al., 2004). This immersion method consists of introducing the 10x10x10 mm³ scaffold into 1 mm of aqueous solution with dye, Figure 2, for 5 minutes, observing the wettability of the sample through the absorption of the liquid.

The parameters evaluated in this test are the absorption time, the height that the liquid reaches the external surface of the sample, if the liquid reaches the center of the scaffold and finally, when removed from the solution, if a gout formation occurs or not and the recording is done with the aid of a camera.

Figure 2 – Aqueous solution of 1 mm height in a petri dish of 56 mm diameter.



2.5. MECHANICAL PROPERTIES

The compressive strength and modulus of elasticity of each sample were measured using a Bose ElectroForce®, 3300 Seria II (Minnesota, USA) at room temperature. The samples with $10 \times 10 \times 10 \text{ mm}^3$ were compressed with a speed of $1 \text{ mm} / \text{min}$ according to the ASTM D695-15.

For the composites, the maximum deformation adopted was 2 mm according to the ASTM D1621-16 and maximum stress as the yield strength calculated with a deformation of 0.2%. In the control group, the maximum stress considered was the fracture stress.

The modulus of elasticity (stiffness) was calculated along the elastic deformation portion.

2.5.1. Statistical analysis

The Kruskal-Wallis non-parametric test followed by the non-parametric multiple comparison test was used to determine if the differences between the groups for both properties were statistically significant at a significance level of 5% ($p < 0.05$).

3. RESULTS AND DISCUSSION

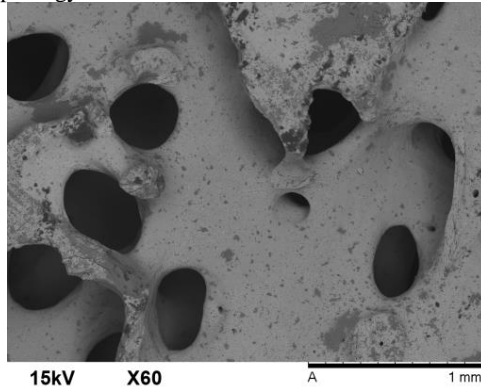
3.1. STRUCTURE, POROSITY AND CHEMICAL ANALYSIS OF PLGA/HA+ β -TCP SCAFFOLDS

For successful osteoconduction, it is of utmost importance that the 3D structure of the scaffold ensures proliferation, cell penetration and vascularization, including adequate diffusion of nutrients to the new cells (ALARIBE; MANOTO; MOTAUNG, 2016; DAI; RABIE, 2007; MA, 2004; O'BRIEN, 2011; RAHAMAN et al., 2011).

For the growth of the new tissue to occur, it is necessary that the scaffold has high connectivity, with interconnected pores of adequate size and morphology, for example; scaffolds with very large pores cannot keep the cells inside, besides causing a reduction in mechanical resistance; in respect to the morphology, rounded pores give the structure greater mechanical properties because they are lower stress concentrators (O'BRIEN, 2011).

An architecture similar to that of human trabecular bone would provide the ideal conditions for vascularization and bone growth (DAI; RABIE, 2007). In this sense, the control group (Bio-Oss Block®), Figure 3, presents the ideal architecture for successful osteoconduction, but with low mechanical resistance.

Figure 3 – Cross section of BioOss® with interconnected porosity and rounded morphology.



In order to create this ideal structure, the solvent evaporation and particle leaching technique was used, which produced a highly porous structure with micropores, mesopores and macropores of sizes around 120, 220 and 680 μm with the morphology of the porogenic agent (sucrose), Figure 4 and 5.

Figure 4 - Sucrose has a rectangular morphology and varied granulometry with an mean size of 500 μm .

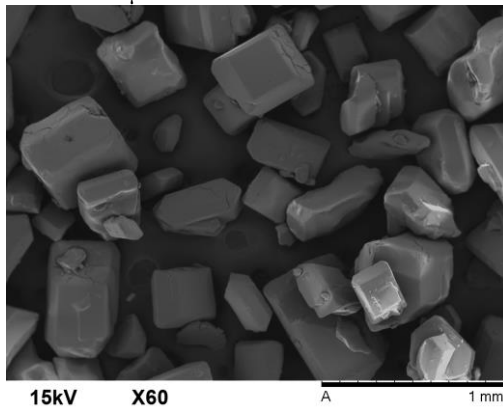
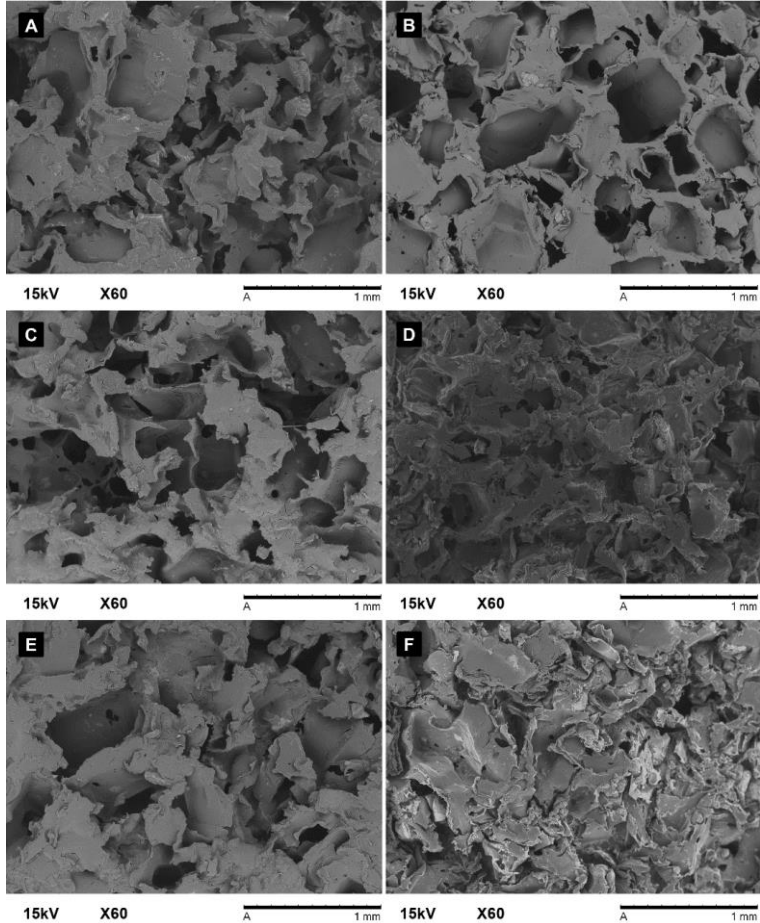


Figure 5 – SEM images of the composites for the surface. With collagen - G1 (A), G2 (C), G3 (E) and without collagen - G4 (B), G5 (D), G6 (F).



In addition to high porosity, the composites showed high interconnectivity, as shown in Figures 6 and 7.

This formed structure results in a larger surface area and greater fluid retention capacity, which provides the structure with conditions to support the vascularization and formation of the new tissue.

Figure 6 – SEM images of the composites for the cross section of the groups with collagen. G1 (A, B), G2 (C, D), G3 (E, F).

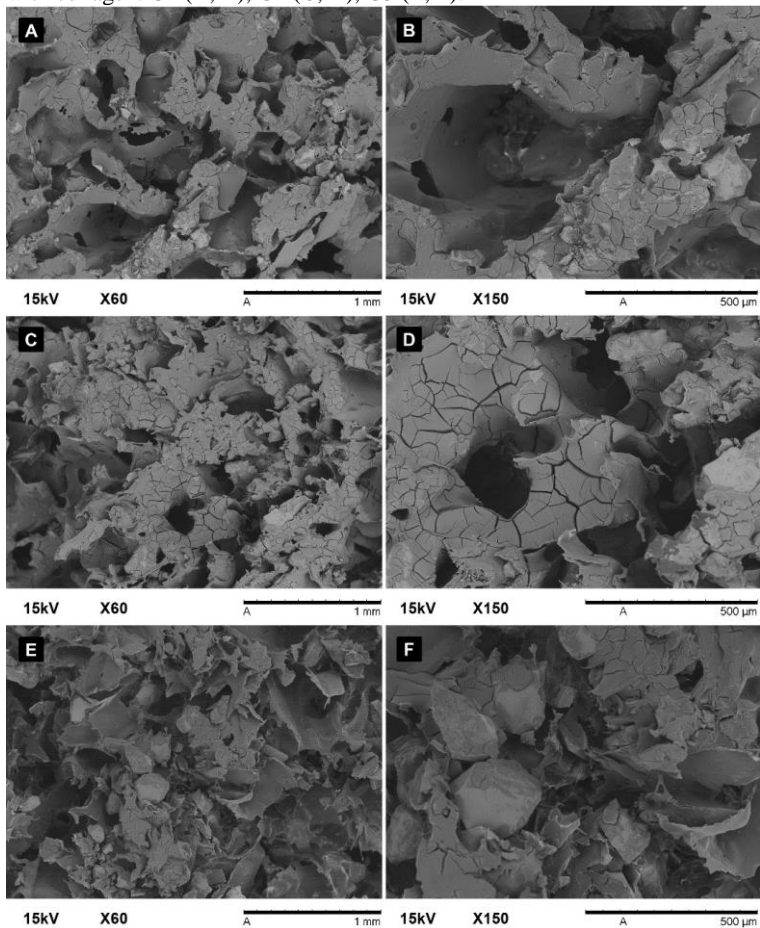
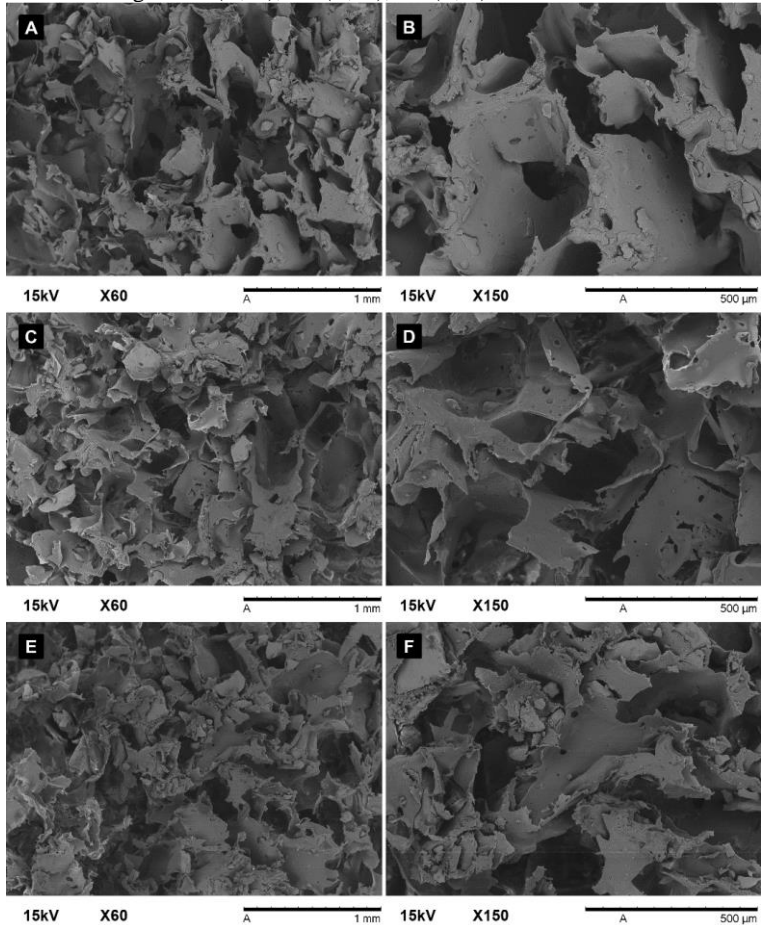


Figure 7 – SEM images of the composites for the cross section of the groups without collagen. G4 (A, B), G5 (C, D), G6 (E, F).

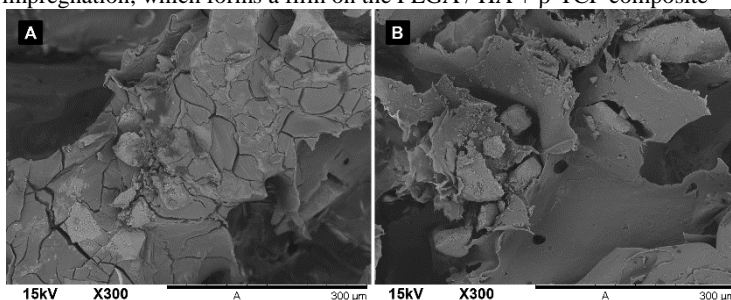


The ceramic particles are dispersed in the polymer matrix, however, forming agglomerations that increase with the proportion of ceramic as well as the amount exposed to the surface. These agglomerations and the fact that the calcium phosphates are not bound to the matrix (PLGA does not cover the particles), due to a

possible lack of chemical interaction between the ceramic and the PLGA, may impair the mechanical resistance of the composites.

The collagen, in addition to rounding the irregular pores formed in the sucrose leaching (Figure 6) is responsible for covering the exposed ceramic particles, as well as the entire PLGA matrix, as shown in Figures 6 and 8.

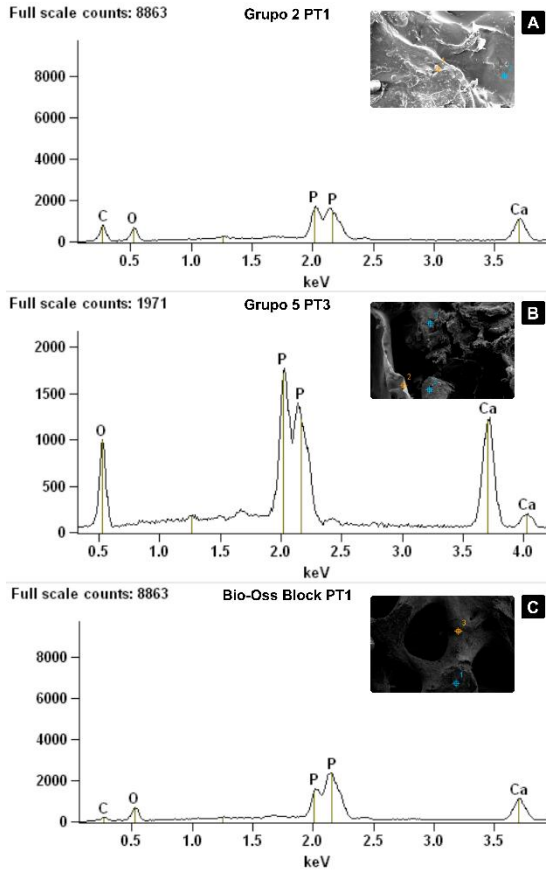
Figure 8 – Comparison between composites with (A) and without (B) collagen impregnation, which forms a film on the PLGA / HA + β -TCP composite



The coating of the ceramic by collagen, due to the fact that there is a chemical interaction between the two, is supported by the literature because the bone consists mainly of two compounds, collagen type 1, which is responsible for 90% of the organic matrix and calcium phosphates, where the HA is the main inorganic compound (GENTILE et al., 2014; KIM et al., 2006; WOJAK-CWIK et al., 2013).

In addition, this chemical similarity is another important feature for a graft. Bone tissue, both human and bovine (Figure 9C), are rich in calcium (Ca) and phosphorus (P) (from calcium phosphates). The scaffolds also presented these elements in their composition, however, the presence of exposed ceramics is variant (Figure 9A and B) depending on the polymer/ceramic ratio and if the scaffold was impregnated with collagen, as explained earlier in this section.

Figure 9 – Chemical analysis of EDS in groups G2 (A) and G5 (B) and control (C).



3.2 PHYSICAL PROPERTIES OF PLGA/HA+ β -TCP SCAFFOLDS

The absorption of fluids in the biomaterials is very important and is related to tissue repair capacity through the transport and distribution of cells in the structure of the scaffolds.

Biodegradable synthetic polymers, such as PLGA, are hydrophobic, therefore, inhibit absorption and do not allow cell adhesion and proliferation, preventing the growth of tissue in their structure (ASTM, 2013; KHANG, 2012; PAMULA et al., 2009).

Thus, it is necessary to use hydrophilic materials, such as collagen to increase wettability, since collagen will interact with proteins and create an environment conducive to tissue growth and regeneration (CHRISTOFFERSEN; LANDIS, 1991; KHANG, 2012; LOKANATHAN; NAICKER, 2014; TOMLINS, 2015; VANDROVCOVÁ; DOUGLAS; HAUKE, 2011; WOJAK-CWIK et al., 2013).

The presence of collagen on the surface of the composite scaffold caused an increase in wettability as shown in Table 2 and Figure 10, absorbing the liquid from the moment of contact, different from the groups that did not receive the collagen, Figure 11, where the scaffolds showed high hydrophobicity not allowing the liquid to penetrate into its structure.

The results obtained are similar to those reported in the literature in which *in vitro* studies on PLGA and PLGA/Collagen scaffolds showed that collagen modified the surface of PLGA allowing greater adhesion and proliferation of cells compared to the PLGA scaffolds (KHANG, 2012; LOKANATHAN; NAICKER, 2014; TOMLINS, 2015) and *in vivo* (LOKANATHAN; NAICKER, 2014).

Table 2 - Results obtained on the wettability of the composite and control groups.

Groups (PLGA/HA+ β -TCP)	Absorption Time (sec)	Liquid Height (mm)	Reached Sample Center	Formed Gout
G1 (50/50) + Collagen	129	10	Yes	No
G2 (60/40) + Collagen	146	5	Yes	Yes
G3 (40/60) + Collagen	157	3	Yes	Yes
G4 (50/50)	*	1	No	Yes
G5 (60/40)	*	1	No	Yes
G6 (40/60)	*	1	No	Yes
Control Bio-Oss Block®	2	10	Yes	No
* The liquid remained in contact only, there was no absorption.				

Figure 10 - Samples for the groups impregnated with collagen (G1, G2 and G3) and the control, immediately after being withdrawn from the solution. The formation of gout in groups G2 and G3 is evident.

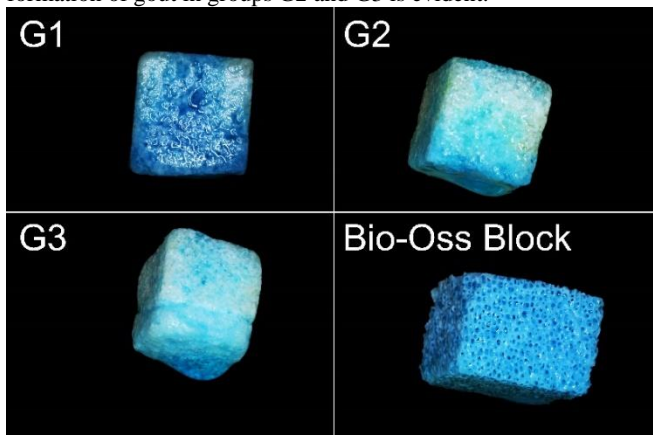
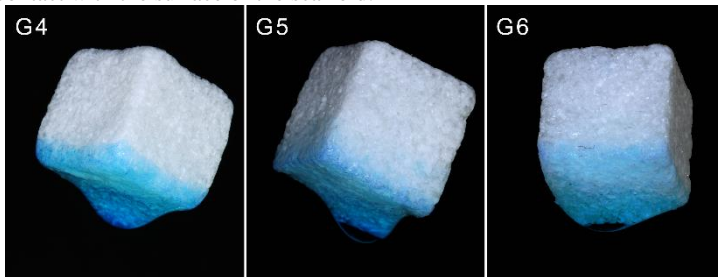


Figure 11 - Samples for the groups without collagen (G4, G5 and G6), immediately after being withdrawn from the solution, which remained only in contact with the surface of the scaffold.



It is possible to notice that the ceramic/polymer ratio influences the wettability, however, this influence is only noticed in the groups that were impregnated with collagen through the variation of the absorption time and in the formation of gout (Table 2).

In this context, the group that presented the greatest similarity to the control group was G1, since it did not present the formation of gout when it was withdrawn from the solution, showing that the liquid remained retained in the structure of the scaffold.

3.3. MECHANICAL PROPERTIES

The scaffolds used for bone regeneration must have mechanical properties similar to those of the tissue that will receive the graft, among which, modulus of elasticity and mechanical strength are the main ones.

The elastic modulus is the property that gives information about the stiffness of the structure of the scaffold, that is, how it will deform when tensioned. If the difference between modules is high, there will be a heterogeneous distribution of stresses, which may lead to failure of the bone or implant (O'BRIEN, 2011).

Regarding the mechanical resistance, this should allow the scaffold to be loaded with compressive and torsional tensions without any structural impairment.

From a practical point of view, the scaffolds must have a minimum resistance allowing them to be handled during implantation (O'BRIEN, 2011). From a practical point of view, the scaffolds must have a minimum resistance allowing them to be handled during implantation (O'BRIEN, 2011).

The major disadvantage of Bio-Oss Block® in clinical use is its fracture at the moment of fixation due to its low mechanical strength, as shown in Table 3. The variation in the values of compressive strength for the control can be explained by the way with which the tensions are distributed in the specimens, which exhibit fragile behavior, such as that of ceramics; the compressive loads are preferably distributed over the more rigid and therefore denser areas. Human trabecular bone exhibits this behavior and due to this, its compressive strength varies between 2 and 10 MPa (KHOJASTEH et al., 2016).

Both the control and the composites presented lower values of compressive strength than the bone, however, the collagen scaffolds showed values closer to the bone, according to Table 3.

Table 3 - Compressive strength of the specimens, expressed by the median value.

Compression Strength (MPa)			
Groups (PLGA/HA+β-TCP)	Median	Minimum	Maximum
G1 (50/50) + Collagen	**1.5	1.32	1.83
G2 (60/40) + Collagen	**1.91	1.78	2,22
G3 (40/60) + Collagen	**1.62	1.51	1.82
G4 (50/50)	*0.96	0.84	1.02
G5 (60/40)	*1,01	0.89	1.67
G6 (40/60)	*1.15	0.76	1.29
Control Bio-Oss Block®	0.34	0.17	0.46
* All presented a statistical difference with the control group			
** Groups G1, G2 and G3 presented statistical difference with groups G4, G5 and G6			

The modulus of elasticity of the stiffer trabecular bone is 1GPa whereas that of the PLGA is around 2GPa (GENTILE et al., 2014; KEAVENY; HAYES, 1993); the control presented close values (Table 4) but with great dispersion. In turn, the scaffolds exhibited much lower stiffness when compared to pure PLGA, control and trabecular bone, that is, when implanted and loaded, the composite scaffold would deform elastically more easily than the bone and would therefore generate heterogeneous distribution of stresses.

Table 4 - Elastic modulus of the specimens, expressed by the median value.

Elastic Modulus (MPa)			
Groups (PLGA/HA+β-TCP)	Median	Minimum	Maximum
G1 (50/50) + Collagen	**18.6	16.7	23.8
G2 (60/40) + Collagen	**28.3	26.7	40.6
G3 (40/60) + Collagen	**22.8	21.9	24.5
G4 (50/50)	13.2	11.4	17.3
G5 (60/40)	15.4	13.8	18.6
G6 (40/60)	15.7	9.5	21.6
Control Bio-Oss Block®	*2882.6	1808.6	3018.9
* The control group presented statistical difference with all the other groups			
** Groups G1, G2 and G3 presented statistical difference with groups G4, G5 and G6			

3.3.1. Effect of biphasic calcium phosphate and collagen on the mechanical properties of composite scaffolds

According to the statistical analysis of Kruskal-Wallis, the mechanical properties of the composites are not affected by the amount of biphasic ceramic added, as compared to that reported in the literature (EBRAHIMIAN-HOSSEINABADI et al., 2011; GENTILE et al., 2014; SHUAI et al., 2013).

Ebrahimian-Hosseiniabadi *et al.* and Shuai *et al.* studied the effect of the addition of bioactive ceramics, BCP and HA, respectively. In both studies, ceramic produced a large increase in the compressive strength and elastic modulus of the scaffolds, however, by increasing the amount of ceramic to more than 20-30% by weight, the two properties decreased dramatically (EBRAHIMIAN-HOSSEINABADI et al., 2011; SHUAI et al., 2013).

In this study, the amount of ceramic used was 50, 60 and 40%wt, the groups with 60%wt, G3 and G6, presented agglomeration of ceramic particles, factor that could decrease the mechanical properties according to the results of Ebrahimian-Hosseiniabadi *et al.* and Shuai *et al.*

The variable that was statistically significant was the impregnation with collagen. The groups that received the collagen (G1, G2 and G3) had higher compressive strength and elastic modulus than the non-collagen groups (G4, G5 and G6).

Collagen, as described and seen in section 3.1 and Figure 6, has a structural role and when by coating the scaffolds, it reinforced the structure enhancing the mechanical properties.

Brodie *et al.* reported that the percentage of HA and TCP affected the results, where of the three groups covered with collagen (75HA25TCP, 50HA50TCP and 25HA75TCP), only one group (50HA50TCP) showed higher values of compressive strength than the same non-coated group (BRODIE; MERRY; GRANT, 2006).

Ou *et al.* reported that the crystallinity and distribution of HA affected the interaction with collagen, where the samples that produced the highest compressive strength and elastic modulus were the ones with the lowest degree of crystallinity and a more homogeneous distribution of the particles (OU *et al.*, 2011).

4. CONCLUSION

[1] The PLGA/HA+ β -TCP scaffolds manufactured by the solvent casting and particulate leaching method presented high porosity and interconnectivity in the porogenic material format, resulting in a higher surface area and fluid retention capacity.

[2] Collagen promoted an increase in the wettability of the composite scaffolds, where the influence of the polymer/ceramic ratio was observed between the three groups, G1, G2 and G3. Among them, G1 (50/50) presented the most similar behavior to the control group, since the solution remained retained in the structure when the sample was removed from the liquid.

[3] The mechanical properties were also influenced by the presence of collagen and the groups with collagen presented statistically higher results than the groups without collagen.

[4] The polymer/ceramic ratio (50/50, 60/40 and 40/60) did not statistically affected the mechanical properties, however, the literature indicates that a lower proportion of ceramic would be ideal for increasing the mechanical resistance and elastic modulus.

[5] The composites developed have characteristics that instigate the study of *in vitro* and *in vivo* behavior for application in bone regeneration.

ARTICLE REFERENCES

- ALARIBE, F. N.; MANOTO, S. L.; MOTAUNG, S. C. K. M. Scaffolds from biomaterials: Advantages and limitations in bone and tissue engineering. **Biologia (Poland)**, v. 71, n. 4, p. 353–366, 2016.
- ASTM. **Standard Guide for Characterization and Testing of Biomaterial Scaffolds Used in Tissue-Engineered Medical Products 1**, 2013.
- BARROW, R. E.; HILLS, B. A critical assessment of the Wilhelmy method in studying lung surfactants. **Journal of physiology**, v. 295, p. 217–27, 1979.
- BRODIE, J. C.; MERRY, J.; GRANT, M. H. The mechanical properties of calcium phosphate ceramics modified by collagen coating and populated by osteoblasts. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 17, n. 1, p. 43–48, 2006.
- BUSER, D. **20 Years of Guided Bone Regeneration in Implant Dentistry**. 2. ed. [s.l.: s.n.].
- CHEN, G.; USHIDA, T.; TATEISHI, T. Scaffold design for tissue engineering. **Macromolecular Bioscience**, v. 2, n. 2, p. 67–77, 2002.
- CHRISTOFFERSEN, J.; LANDIS, W. J. A contribution with review to the description of mineralization of bone and other calcified tissues in vivo. **The Anatomical Record**, v. 230, n. 4, p. 435–450, 1 ago. 1991.
- DAHLIN, C. et al. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. **Plastic & Reconstructive Surgery**, v. 81, p. 672–6, 1988.
- DAI, J.; RABIE, A. B. M. VEGF: an essential mediator of both angiogenesis and endochondral ossification. **Journal of dental research**, v. 86, n. 10, p. 937–950, 2007.
- DALTON, P. D.; WOODFI, T. Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering. **Bone**, v. 32, n. 3, p. 2004–2005, 2008.
- DORATI, R. et al. Effect of porogen on the physico-chemical properties and degradation performance of PLGA scaffolds. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, n. 4, p. 694–701, 2010.
- EBRAHIMIAN-HOSSEINABADI, M. et al. Evaluating and Modeling the Mechanical Properties of the Prepared PLGA/nano-

- BCP Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. **Journal of Materials Science & Technology**, v. 27, n. 12, p. 1105–1112, 2011.
- GENTILE, P. et al. An overview of poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 3, p. 3640–3659, 2014.
- HAY, E. D. Collagen and other matrix glycoproteins in embryogenesis. In: HAY, E. D. (Ed.). **Cell Biology of the Extracellular Matrix**. Second Edi ed. New York, NY: Springer, Boston, MA, 1991. p. 419–462.
- IGNJATOVIĆ, N. L. et al. Micro- and nano-injectable composite biomaterials containing calcium phosphate coated with poly(dl-lactide-co-glycolide). **Acta Biomaterialia**, v. 3, n. 6, p. 927–935, 2007.
- KEAVENY, T. M.; HAYES, W. C. Mechanical Properties of Cortical and Trabecular Bone. **Bone**, n. January 1993, p. 285–344, 1993.
- KHANG, G. **Handbook of Intelligent Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine**. [s.l.] CRC Press, 2012.
- KHOJASTEH, A. et al. Development of PLGA-coated β -TCP scaffolds containing VEGF for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 69, p. 780–788, 2016.
- KIM, S.-S. et al. Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 27, n. 8, p. 1399–1409, 2006.
- LANAO, R. P. F. et al. Physicochemical properties and applications of poly(lactic-co-glycolic acid) for use in bone regeneration. **Tissue engineering. Part B, Reviews**, v. 19, n. 4, p. 380–90, 2013.
- LAURENCIN, C. T. et al. Tissue engineered bone-regeneration using degradable polymers: The formation of mineralized matrices. **Bone**, v. 19, p. S93-99, 1998.
- LEGEROS, R. Z. Properties of osteoconductive biomaterials: Calcium phosphates. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 395, n. 395, p. 81–98, 2002.
- LEKHOLM, U. et al. Marginal tissue reactions at osseointegrated titanium fixtures. (II) A cross-sectional retrospective study. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 15, n.

1, p. 53–61, fev. 1986.

LOKANATHAN, Y.; NAICKER, A. S. Collagen Coated PLGA Seeded with Neural-Differentiated Human Mesenchymal. p. 353–362, 2014.

MA, P. X. Scaffolds for tissue fabrication. **Materials Today**, v. 7, n. 5, p. 30–40, 2004.

MARRA, K. G. et al. In vitro analysis of biodegradable polymer bled/hydroxiapatite composites for bone tissue engineering. **Biomedical Materials Research Part C**, v. 47, p. 324–335, 1999.

MCALLISTER, B. S.; HAGHIGHAT, K. Bone Augmentation Techniques. **Journal of Periodontology**, v. 78, n. 3, p. 377–396, 2007.

MESSIAS, A. D.; ARAGONES, A.; DUEK, E. A. DE R. PLGA-Hydroxyapatite Composite Scaffolds for Osteoblastic-Like Cells. **Key Engineering Materials**, v. 396–398, p. 461–464, 2009.

NAIK, A. et al. The effect of the type of HA on the degradation of PLGA/HA composites. **Materials Science and Engineering C**, v. 70, p. 824–831, 2017.

NAVARRO, M. et al. Biomaterial scaffold fabrication techniques for potential tissue engineering applications. **Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications**, v. 4, n. 3, p. 141–159, 2010.

O'BRIEN, F. J. Biomaterials & Scaffolds for Tissue Engineering. **Materials Today**, v. 14, n. 3, p. 88–95, 2011.

OU, K. L. et al. Effect of collagen on the mechanical properties of hydroxyapatite coatings. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 4, n. 4, p. 618–624, 2011.

PAMULA, E. et al. Resorbable polymeric scaffolds for bone tissue engineering: The influence of their microstructure on the growth of human osteoblast-like MG 63 cells. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 89, n. 2, p. 432–443, 2009.

PETER, S. J. et al. Polymer concepts in tissue engineering. **Journal of biomedical materials research**, v. 43, n. 4, p. 422–427, 1998.

PORTER, J. R.; RUCKH, T. T.; POPAT, K. C. Bone tissue engineering: A review in bone biomimetics and drug delivery strategies. **Biotechnology Progress**, v. 25, n. 6, p. 1539–1560, 2009.

RAHAMAN, M. N. et al. Bioactive glass in tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 6, p. 2355–2373, 2011.

- RUPP, F. et al. Roughness induced dynamic changes of wettability of acid etched titanium implant modifications. **Biomaterials**, v. 25, n. 7–8, p. 1429–1438, 2004.
- SHUAI, C. et al. Development of composite porous scaffolds based on poly(lactide-co- glycolide)/nano-hydroxyapatite via selective laser sintering. **International Journal of Advanced Manufacturing Technology**, v. 69, n. 1–4, p. 51–57, 2013.
- TOMLINS, P. **Characterisation and Design of Tissue Scaffolds**. [s.l: s.n.].
- TONGKUI CUI et al. Rapid Prototyping a Double-layer Polyurethane--collagen Conduit and its Schwann Cell Compatibility. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 24, n. 1 Suppl, p. 5–17, 2009.
- URBAN, I. Membranes and Graft Materials. In: **Vertical and horizontal ridge augmentation - New perspective**. [s.l.] Quintessence Pub Co, 2017. p. 400.
- VANDROVCOVÁ, M.; DOUGLAS, T.; HAUKE, D. Influence of Collagen and Chondroitin Sulfate (CS) Coatings on Poly- (Lactide-co-Glycolide) (PLGA) on MG 63 Osteoblast-Like Cells. v. 8408, n. July, p. 797–813, 2011.
- WOJAK-CWIK, I. M. et al. Poly(L -lactide-co-glycolide) scaffolds coated with collagen and glycosaminoglycans: Impact on proliferation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 101, n. 11, p. 3109–3122, 2013.
- YANG, F. et al. Poly(1,1-lactide-co-glycolide)/tricalcium phosphate composite scaffold and its various changes during degradation in vitro. **Polymer Degradation and Stability**, v. 91, n. 12, p. 3065–3073, 2006.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALARIBE, F. N.; MANOTO, S. L.; MOTAUNG, S. C. K. M. Scaffolds from biomaterials: Advantages and limitations in bone and tissue engineering. **Biologia (Poland)**, v. 71, n. 4, p. 353–366, 2016.
- ASTM. **Standard Guide for Characterization and Testing of Biomaterial Scaffolds Used in Tissue-Engineered Medical Products 1**, 2013.
- BARROW, R. E.; HILLS, B. A critical assessment of the Wilhelmy method in studying lung surfactants. **Journal of physiology**, v. 295, p. 217–27, 1979.
- BRODIE, J. C.; MERRY, J.; GRANT, M. H. The mechanical properties of calcium phosphate ceramics modified by collagen coating and populated by osteoblasts. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 17, n. 1, p. 43–48, 2006.
- BUSER, D. **20 Years of Guided Bone Regeneration in Implant Dentistry**. 2. ed. [s.l.: s.n.].
- CHEN, G.; USHIDA, T.; TATEISHI, T. Scaffold design for tissue engineering. **Macromolecular Bioscience**, v. 2, n. 2, p. 67–77, 2002.
- CHRISTOFFERSEN, J.; LANDIS, W. J. A contribution with review to the description of mineralization of bone and other calcified tissues in vivo. **The Anatomical Record**, v. 230, n. 4, p. 435–450, 1 ago. 1991.
- DAHLIN, C. et al. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. **Plastic & Reconstructive Surgery**, v. 81, p. 672–6, 1988.
- DAI, J.; RABIE, A B. M. VEGF: an essential mediator of both angiogenesis and endochondral ossification. **Journal of dental research**, v. 86, n. 10, p. 937–950, 2007.
- DALTON, P. D.; WOODFI, T. Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering. **Bone**, v. 32, n. 3, p. 2004–2005, 2008.
- DORATI, R. et al. Effect of porogen on the physico-chemical properties and degradation performance of PLGA scaffolds. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, n. 4, p. 694–701, 2010.
- EBRAHIMIAN-HOSSEINABADI, M. et al. Evaluating and Modeling the Mechanical Properties of the Prepared PLGA/nano-BCP Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. **Journal of**

- Materials Science & Technology**, v. 27, n. 12, p. 1105–1112, 2011.
- GENTILE, P. et al. An overview of poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 3, p. 3640–3659, 2014.
- HAY, E. D. Collagen and other matrix glycoproteins in embryogenesis. In: HAY, E. D. (Ed.). **Cell Biology of the Extracellular Matrix**. Second Edi ed. New York, NY: Springer, Boston, MA, 1991. p. 419–462.
- IGNJATOVIĆ, N. L. et al. Micro- and nano-injectable composite biomaterials containing calcium phosphate coated with poly(dl-lactide-co-glycolide). **Acta Biomaterialia**, v. 3, n. 6, p. 927–935, 2007.
- KEAVENY, T. M.; HAYES, W. C. Mechanical Properties of Cortical and Trabecular Bone. **Bone**, n. January 1993, p. 285–344, 1993.
- KHANG, G. **Handbook of Intelligent Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine**. [s.l.] CRC Press, 2012.
- KHOJASTEH, A. et al. Development of PLGA-coated β -TCP scaffolds containing VEGF for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 69, p. 780–788, 2016.
- KIM, S.-S. et al. Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 27, n. 8, p. 1399–1409, 2006.
- LANAO, R. P. F. et al. Physicochemical properties and applications of poly(lactic-co-glycolic acid) for use in bone regeneration. **Tissue engineering. Part B, Reviews**, v. 19, n. 4, p. 380–90, 2013.
- LAURENCIN, C. T. et al. Tissue engineered bone-regeneration using degradable polymers: The formation of mineralized matrices. **Bone**, v. 19, p. S93-99, 1998.
- LEGEROS, R. Z. Properties of osteoconductive biomaterials: Calcium phosphates. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 395, n. 395, p. 81–98, 2002.
- LEKHOLM, U. et al. Marginal tissue reactions at osseointegrated titanium fixtures. (II) A cross-sectional retrospective study. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 15, n. 1, p. 53–61, fev. 1986.

- LOKANATHAN, Y.; NAICKER, A. S. Collagen Coated PLGA Seeded with Neural-Differentiated Human Mesenchymal. p. 353–362, 2014.
- MA, P. X. Scaffolds for tissue fabrication. **Materials Today**, v. 7, n. 5, p. 30–40, 2004.
- MARRA, K. G. et al. In vitro analysis of biodegradable polymer bled/hydroxiapatite composites for bone tissue engineering. **Biomedical Materials Research Part C**, v. 47, p. 324–335, 1999.
- MCALLISTER, B. S.; HAGHIGHAT, K. Bone Augmentation Techniques. **Journal of Periodontology**, v. 78, n. 3, p. 377–396, 2007.
- MESSIAS, A. D.; ARAGONES, A.; DUEK, E. A. DE R. PLGA-Hydroxyapatite Composite Scaffolds for Osteoblastic-Like Cells. **Key Engineering Materials**, v. 396–398, p. 461–464, 2009.
- NAIK, A. et al. The effect of the type of HA on the degradation of PLGA/HA composites. **Materials Science and Engineering C**, v. 70, p. 824–831, 2017.
- NAVARRO, M. et al. Biomaterial scaffold fabrication techniques for potential tissue engineering applications. **Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications**, v. 4, n. 3, p. 141–159, 2010.
- O'BRIEN, F. J. Biomaterials & Scaffolds for Tissue Engineering. **Materials Today**, v. 14, n. 3, p. 88–95, 2011.
- OU, K. L. et al. Effect of collagen on the mechanical properties of hydroxyapatite coatings. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 4, n. 4, p. 618–624, 2011.
- PAMULA, E. et al. Resorbable polymeric scaffolds for bone tissue engineering: The influence of their microstructure on the growth of human osteoblast-like MG 63 cells. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 89, n. 2, p. 432–443, 2009.
- PETER, S. J. et al. Polymer concepts in tissue engineering. **Journal of biomedical materials research**, v. 43, n. 4, p. 422–427, 1998.
- PORTER, J. R.; RUCKH, T. T.; POPAT, K. C. Bone tissue engineering: A review in bone biomimetics and drug delivery strategies. **Biotechnology Progress**, v. 25, n. 6, p. 1539–1560, 2009.
- RAHAMAN, M. N. et al. Bioactive glass in tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 6, p. 2355–2373, 2011.
- RUPP, F. et al. Roughness induced dynamic changes of wettability

of acid etched titanium implant modifications. **Biomaterials**, v. 25, n. 7–8, p. 1429–1438, 2004.

SHUAI, C. et al. Development of composite porous scaffolds based on poly(lactide-co- glycolide)/nano-hydroxyapatite via selective laser sintering. **International Journal of Advanced Manufacturing Technology**, v. 69, n. 1–4, p. 51–57, 2013.

TOMLINS, P. **Characterisation and Design of Tissue Scaffolds**. [s.l: s.n.].

TONGKUI CUI et al. Rapid Prototyping a Double-layer Polyurethane--collagen Conduit and its Schwann Cell Compatibility. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 24, n. 1 Suppl, p. 5–17, 2009.

URBAN, I. Membranes and Graft Materials. In: **Vertical and horizontal ridge augmentation - New perspective**. [s.l.]

Quintessence Pub Co, 2017. p. 400.

VANDROVCOVÁ, M.; DOUGLAS, T.; HAUKE, D. Influence of Collagen and Chondroitin Sulfate (CS) Coatings on Poly- (Lactide-co-Glycolide) (PLGA) on MG 63 Osteoblast-Like Cells. v. 8408, n. July, p. 797–813, 2011.

WOJAK-CWIK, I. M. et al. Poly(L -lactide-co-glycolide) scaffolds coated with collagen and glycosaminoglycans: Impact on proliferation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 101, n. 11, p. 3109–3122, 2013.

YANG, F. et al. Poly(1,1-lactide-co-glycolide)/tricalcium phosphate composite scaffold and its various changes during degradation in vitro. **Polymer Degradation and Stability**, v. 91, n. 12, p. 3065–3073, 2006.